

THE CHEMICAL TIMES

2025 No.1 (通巻275号)
ISSN 0285-2446

02 新年を迎えて 代表取締役社長 野澤 学

特 集

創薬を加速させる肝疾患・肝障害研究

03 In vitroおよびin vivoにおける肝疾患の治療法開発系

東海大学 医学部医学科基礎医学系分子生命科学領域 教授 紙谷 聡英

09 薬物性肝障害におけるバイオマーカーと診断の進歩

東海大学 医学部内科学系消化器内科学 講師 鶴谷 康太
東海大学 医学部内科学系消化器内科学 教授 加川 建弘

14 薬物性肝障害の予測を目指したin vitro評価系の構築

千葉大学大学院 薬学研究院生物薬剤学研究室 助教 竹村 晃典

トピックス

20

サンドイッチ培養を用いずに 毛細胆管の形成・維持が可能な培地

関東化学株式会社 技術・開発本部 生命科学研究所 研究員 渡邊 輝彦
関東化学株式会社 技術・開発本部 生命科学研究所 研究員 福田 翼



KANTO CHEMICAL CO., INC.



新年を迎えて

代表取締役社長 野澤 学

あけましておめでとうございます。

「THE CHEMICAL TIMES」の読者の皆様におかれましては、つつがなく良い新年を迎えられたことと心よりお慶び申し上げます。

昨年は、1月の能登半島地震に端を発し、自然災害に悩まされた一年でした。1898年から続く気象庁の統計記録を塗り替える気温上昇により、熱中症や農作物被害などへの影響が深刻化し、気温上昇が原因と見られる水害も数多く発生しています。九州全域を記録的豪雨が襲った7月には、広範囲にわたる洪水や土砂崩れの被害がありました。9月の奥能登豪雨では、再興に尽力していた能登半島にさらなる追い打ちをかけたことも記憶に新しいところです。被害に遭われた皆さまには心よりお見舞い申し上げます。

経済情勢においては、AIをはじめとする半導体ビジネスの好調が続いており、国内でも官民をあげて活発な設備投資が進められています。昨年7月には日経平均株価が一時的に42,000円を越える最高値を示す局面がありましたが、その後は金融政策の動きと国内外の政局などを反映した乱高下が続いています。主要通貨に対する為替は依然として円安基調で推移しており、とくに輸入品のビジネスには非常に厳しい状況となっています。昨年発足した石破新内閣には、トランプ次期大統領の政策に惑わされず、経済成長に加えて外交に平和的な役割を果たして頂くことを期待したいと思います。

さて、2024年のノーベル生理学・医学賞は「マイクロRNAの発見と転写後の遺伝子発現制御における役割の解明」により、米国のビクター・アンブロス教授とゲイリー・ラブカン教授が受賞しました。彼らの研究は、20～30塩基の小さなRNA（マイクロRNA）が遺伝子の発現制御に重要な役割を果たすことを明らかにし、癌や心臓病などの治療法開発に新たな道を切り開きました。また、ノーベル化学賞は「コンピューターによるタンパク質の設計」によ

り、米国のデイビッド・ベイカー教授、英国IT企業のデミス・ハサビス氏、ジョン・ジャンパー氏の3名が受賞しました。彼らはAIを用いてタンパク質の複雑な構造を予測するモデルを開発し、薬剤開発や病気の理解、生命科学分野の研究に革命をもたらしました。AIという新たなツールが様々な分野に普及することにより、研究開発の進め方にも大きな変化が感じられます。受賞の皆様にお慶び申し上げるとともに、ますますのご活躍を祈念しております。

当社は昨年11月13日に創立80周年を迎えました。これはひとえにお客様、お取引の皆様、読者の皆様によるご厚情の賜物と深く感謝申し上げます。1944年の創業以来総合試薬メーカーとして、医療・食品・環境・半導体・バイオサイエンス分野など幅広い領域で、基礎研究用試薬から最先端の研究に必要な高機能性薬品、高純度試薬、素材・材料などの開発に積極的に取り組んでまいりました。これからも将来の社会変化に応じた最高品質の製品・信頼を提供し、科学の発展と生活の安心を支えつつ皆様のお役に立てるよう努力してまいります。

本誌は1950年の創刊以来、今号で275号となりました。本号では、『創業を加速させる肝疾患・肝障害研究』をテーマとして、創業における最新のアプローチについて著名な先生方にご寄稿いただきました。従来、創業の過程では動物実験が広く行われてきましたが、動物と人間の種差による肝障害のリスクや動物愛護の観点から多くの課題がありました。そこで、近年では肝臓の細胞や組織モデル、オルガノイドを用いて薬物の肝毒性を評価する研究が進んでいます。

今後も本誌を通じて、読者の皆様に革新的な取り組みをお届けできるよう取り組んでまいります。

2025年「巳年」が、脱皮しながら成長する巳のごとく再生と変化を繰り返す“幸多い年”でありますよう心よりお祈り申し上げます。

In vitroおよびin vivoにおける肝疾患の治療法開発系

In vitro and in vivo analyses for therapy of liver diseases

紙谷 聡英
Akihide Kamiya

東海大学 医学部医学科 基礎医学系分子生命科学領域(教授)
Department of Molecular Life Sciences, Tokai University School of Medicine (Professor)

KEYWORD ▶

多能性幹細胞

病態モデル

ゲノム編集

はじめに

01

本稿では、ヒト病態モデルの再現におけるin vitro、in vivo実験系の現状を概説し、それらの知見からヒトとマウスなどの実験動物の種差と病態解析との関係について述べる。肝臓における様々な代謝酵素には種差があり、薬物代謝や胆汁酸合成など肝臓の主要な機能においてマウス独自の代謝系が存在する。ゲノム編集技術の進展により、ヒト疾患に関係する変異のin vitro、in vivoでの効率的な誘導が可能となってきた。そこで、ヒト肝細胞を用いた培養系やヒトに近づけた代謝系を持つ遺伝子改変マウスの作製などを通じて、よりヒト病態を再現するモデル系の確立法とその有用性について解説する。

肝臓の機能と肝疾患の関連

02

肝臓は生体内最大の臓器であり、血清タンパク質の合成、胆汁の分泌、アルコールや外来薬物の分解、糖・脂質代謝など様々な代謝機能を通じて、生体のホメオスタシス維持を行っている。そのため、肝臓の機能破綻は重大な疾患につながる。例えば、肝炎ウイルスの持続感染や肥満・運動不足によって脂肪肝(肝臓への脂質の異常蓄積)が誘導される。脂肪肝患者のほとんどは良性であるが、一部は慢性肝炎から肝硬変・肝癌などの重篤な疾患を引き起こす。これらの進行した肝疾患に対しては肝臓移植が根治療法となるが、脳死移植におけるドナー不足や生体肝移植における健常人ドナーへの侵襲性といった問題がある。そこで、このような重篤な肝疾患に対する新たな治療法の開発が望まれている。

肝臓の様々な代謝機能を司る細胞が肝細胞(肝実質細胞)であり、肝臓の幅広い代謝機能を担う数多くの代謝関連タンパク質を発現している。したがって、これらの代謝関連タンパク質

やその転写発現を司る転写制御因子の変異・欠損は、肝疾患の病態の増悪化などにつながる可能性がある。例えば、PNPLA3は脂肪滴膜に局在するトランスアミラーゼやリパーゼの制御タンパク質であり、GWAS解析から代謝機能障害関連脂肪肝(MASH)への関与が指摘されている¹⁾。また、脂肪酸代謝を制御する転写制御因子とMASHとの関連も複数報告されている。BCL6は免疫系の胚中心形成に必須の転写制御因子だが、肝臓では脂質代謝や薬物代謝酵素の発現制御に関係する^{2, 3)}。我々を含む複数のグループが、肝特異的*Bcl6*欠損マウスを用いた解析から、脂肪肝やMASHの病態進行、肝発癌の過程にBCL6が促進的に作用することを報告している^{4, 5)}。PNPLA3とBCL6は脂肪性肝疾患の有望な治療ターゲットと考えられているが、*Pnpla3*欠損マウスを用いた解析でPNPLA3と脂肪性肝疾患との関連は見出されなかったとする報告や⁶⁾、病態モデルマウスにおけるBCL6の過剰発現が慢性肝炎に抑制的に作用するといった報告も存在する⁷⁾。このように、肝機能遺伝子と肝病態との関連性には未だ不明な点が多い。

発生過程において肝臓は、腸管の一部が心筋・横隔膜からの液性因子を介した刺激を受けて肝芽として分化することから始まる。その後、胎生中期の肝臓は造血器官として造血幹細胞の増幅・各種の血液細胞への分化の場として働いた後、成体では代謝器官としての様々な機能を獲得していく。この時期の血液細胞と肝前駆細胞との相互作用が肝の発生過程に重要であることがわかっており、肝成熟を促進する因子としてオンコスタチンM(OSM)が同定されている⁸⁾。また、肝臓には肝細胞以外に様々な種類の非実質細胞が存在しており、肝内胆管を形成する胆管細胞、毛細血管網を形成する類洞内皮細胞、肝内線維芽細胞でありビタミンなどを蓄積する星細胞、肝内マクロファージであるクッパー細胞などがこれにあたる。肝細胞と胆管細胞は同じ肝前駆細胞を起源としている。また、星細胞は肝傷害の過程で活性型に変化し、コラーゲンなどの合成・分泌を通じて肝線維化に重要な役割を果たしている。そのため、これらの細胞は胆汁うっ滞疾

患や肝硬変・肝癌形成における原因細胞として、治療のターゲットに考えられている。

肝疾患のターゲット同定や治療法開発において、マウスなどのモデル動物が重要な役割を果たしているが、マウスとヒトの種差に起因する問題点も多い。例えば、肝臓の重要な機能の一つである薬物代謝は、Cytochrome P450 (CYP) 加水分解酵素ファミリーによって担われている。しかし、CYPの活性や発現には種差があり、マウスとヒトでは発現する酵素群の種類の違いから、薬物や外来からの化合物に対する肝臓での分解活性が異なり、ヒトの肝疾患再現の障害になっている。その解決手段の一つとして、ヒト肝細胞培養による病態解析系の構築が進められている。ヒト肝細胞の培養は主に肝移植ドナーや肝癌の切除サンプルから得られた初代ヒト肝細胞が用いられているが、安定供給や数量の面での問題が多い。近年、ヒト多能性幹細胞 (Embryonic Stem cells: ES細胞, induced Pluripotent Stem cells: iPS細胞) の樹立や肝細胞系への分化誘導法の開発により、ヒト多能性幹細胞を用いた肝病態解析モデルの開発が進められている。また、最近ではゲノム編集技術の進展により、多能性幹細胞やそこから分化した細胞に対して任意の遺伝子欠損や改変を行うことができる。特に、CRISPR/Cas9の開発によって簡便・高確率に様々な細胞のゲノム改変が可能になっている。この手法を用いて、疾患を誘導する遺伝子変異を多能性幹細胞などに導入したうえで機能細胞に分化させ、疾患のフェノタイプをin vitroで解析する手法が様々な臓器の細胞で開発されている。ヒトiPS細胞由来肝細胞にゲノム編集を行い、肝炎ウイルス感染受容体や代謝関連遺伝子の変異を誘導することで、様々な疾患やウイルス生活環の解析が行われている。また、ヒト肝細胞を移植したキメラマウスや、ヒト類似の代謝経路を持つ遺伝子改変マウスなど、in vivoでもヒト環境を模した病態再現系が構築されている。以降の章では、このようなヒト肝疾患のin vitro, in vivoモデルについて紹介する。

多能性幹細胞を用いた 肝細胞・肝組織培養系と疾患解析への応用 03

ES細胞やiPS細胞は、高増殖能と様々な臓器の機能細胞への多分化能を有する多能性幹細胞であり、再生医療や様々な疾患解析の有用なツールとして注目されている。ES細胞やiPS細胞からの肝細胞への分化誘導は、生体の肝分化をin vitroで模倣する形で行われており、Activin, fibroblast growth factor (FGF), hepatocyte growth factor (HGF), OSMといったサイトカインの連続添加により、内胚葉前駆細胞、肝幹・前駆細胞、胎生肝細胞、成熟肝細胞へ連続的に分化させることができる⁹⁾。また、肝前駆細胞の段階で細胞表面抗原を指標に純化・拡大培養を行った後、肝成熟化を促進することで、効率的に多数の成熟肝細胞を得る系が樹立されている。例えば、我々はマウス胎仔・成体肝臓における肝前駆細胞の解析から、CD13、CD133と

いった肝前駆細胞特異的表面抗原を同定した¹⁰⁾。さらに、ヒトiPS細胞から肝臓系細胞を誘導した後に、抗CD13およびCD133抗体を用いてヒトiPS細胞由来肝前駆細胞を純化・拡大培養し、成熟肝細胞へと分化誘導可能な系を報告している^{11, 12)}。他にも、carboxypeptidase Mなどがヒト多能性幹細胞由来肝前駆細胞のマーカーとして知られ、細胞の純化培養に用いられている¹³⁾。

これらのヒト多能性幹細胞由来肝前駆細胞は、長期拡大培養や凍結保存が可能であるため、少数の細胞でも効率的に利用することができる。また、分化培地に置換することで成熟肝細胞様の機能を誘導可能であり、ヒト肝細胞の解析や治療モデルへの応用に適すると考えられる。一方、初代ヒト肝細胞の培養系と比較すると肝機能遺伝子の発現レベルが低いなどの問題点もある。これに対しては、肝臓特異的な転写制御因子などを分化誘導過程で導入することで、肝分化・肝成熟の効率化が可能である。例えば、多能性幹細胞から内胚葉前駆細胞などを誘導する分化系の初期段階では、hepatocyte nuclear factor (HNF) 1 α やHNF4 α などの転写制御因子をアデノウイルスで導入することで効率が上昇することが知られている¹⁴⁾。我々は、肝発生過程で発現変化する転写制御因子群の網羅的発現解析の結果を用いて、幼弱な肝細胞の成熟化を促進する新規転写制御因子のスクリーニングを行った(図1)。その結果、KLF15の強制発現によってヒトiPS細胞由来肝前駆細胞の成熟肝機能をより効率的に誘導できることを見出している。KLF15は肝機能遺伝子の上流領域に結合してその活性を誘導するだけでなく、p57の発現誘導を介して細胞周期を抑制することで肝前駆細胞の分化段階を制御することが示唆された¹⁵⁾。

一方、肝前駆細胞を細胞外マトリックスに包埋培養することで、胆管系組織を誘導することができる¹¹⁾。そこで、ゲノム編集技術を用いて胆管疾患の原因遺伝子変異を持つヒトiPS細胞を樹立し、肝前駆細胞、さらに胆管様細胞へと分化誘導することで、胆管疾患のフェノタイプのin vitro再現を試みた(図1)。多発肝嚢胞症は肝内に多数の嚢胞が生じる遺伝性疾患であり、肝臓にのみ嚢胞が多発する常染色体優性多嚢胞性肝疾患 (ADPLD) などが知られる。ADPLDはProtein Kinase C substrate 80K-H (PRKCSH) やSEC63などの纖毛関連遺伝子が病因遺伝子として同定されている。そこで、PRKCSHを欠損させたヒトiPS細胞をゲノム編集により樹立した後に、肝前駆細胞・胆管細胞へと分化誘導することで、in vitroでの多発肝嚢胞の病態再現系を構築した。その結果、PRKCSH欠損ヒトiPS細胞に由来する肝前駆細胞では、胆管細胞への分化能が亢進していることを見出した¹⁶⁾。この結果は、PRKCSHを含む纖毛からのシグナルが肝前駆細胞の胆管細胞への分化能を制御することを示唆しており、多発肝嚢胞症の治療法開発につながる事が期待される。

実際の生体内の臓器は3次元構造を取っており、in vitroでその機能を正確に再現するためには、本来の構造を模倣する形で、細胞を平面培養ではなく立体培養条件で培養する必要がある。さらに、肝臓は肝細胞だけでなく星細胞などの多種類の非実質

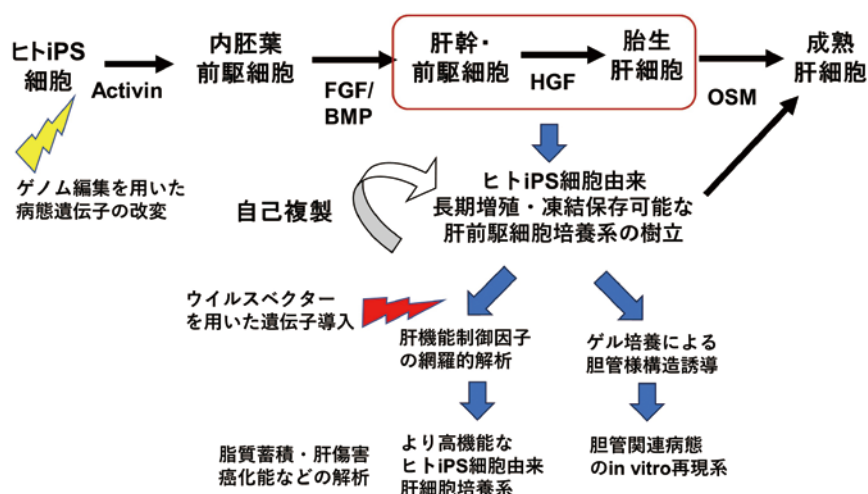


図1 ヒトiPS細胞由来細胞を用いた病態再現系
病態解析のための遺伝子操作として、iPS細胞にゲノム編集を行うことで病態関連因子の変異を誘導する方法や、ヒトiPS細胞由来肝前駆細胞にレトロウイルス等で遺伝子導入を行う方法がある。
得られた細胞を肝細胞・胆管細胞などへ分化誘導し、病態解析などに用いる。

細胞を含んでおり、細胞間相互作用が様々な肝機能を制御している。そこで、ヒトiPS細胞から誘導した肝前駆細胞にヒト内皮細胞株、線維芽細胞株を共培養すると、肝前駆細胞の細胞接着・自己凝集能や非実質細胞からのパラクラインシグナルによって立体的なLiver budが形成される¹⁷⁾。また、特定の条件下でヒトiPS細胞を誘導すると、肝細胞とクッパー細胞、星細胞、胆管様細胞などの他の肝非実質細胞に分化可能である。そこで、ヒトiPS細胞から肝細胞および他の実質細胞を分化誘導した後に、それらを共培養することでヒト由来の肝臓様構造体を人工的に作製する試みが報告され、肝臓オルガノイドと呼ばれる¹⁸⁾。このようなヒト肝臓オルガノイドでは、培養液に過剰な脂肪酸を添加することで肝細胞内の脂質蓄積が誘導され、炎症性サイトカインの発現、星細胞の活性化およびそれに伴う細胞外マトリックスの発現と蓄積が引き起こされた¹⁹⁾。この系を用いることで、in vitroでヒトMASHの病態を模倣し、薬物または阻害剤添加の効果を評価することができる。ヒト肝臓様構造を人工的に再現する別の方法として、脱細胞化肝組織由来の細胞外マトリックスを使用した系が報告されている。例えば、ラット肝臓をドデシル硫酸ナトリウムで灌流して脱細胞化し、外来性肝細胞を灌流して人工肝臓を再構成できる²⁰⁾。このような脱細胞化組織は、肝小葉構造を維持する細胞外マトリックス構造を有しており、外部から細胞を播種することで肝臓本来の立体構造の再現が可能である。この方法を用いて、ヒト脂肪肝のin vitro再現実験が確立された。ヒトiPS細胞由来肝細胞と非実質細胞を、脱細胞化したラット肝臓に接種してヒト人工肝臓を作製できる。この際に、*SIRT1*遺伝子抑制により肝代謝異常を誘導することで、ヒト疾患と同様の脂肪肝や肝炎をin vitroで再現した系が報告されている²¹⁾。これらの新しいin vitro培養・疾患モデルやゲノム編集技術は、MASH治療の新薬発見に有用である。

In vivoゲノム編集技術を応用した 肝疾患解析系の構築

04

In vivoの動物モデルにおいても、種差を軽減しヒト型の疾患を模倣する系の構築が進んでいる。ヒト肝細胞は、発現する酵素群などの差異からマウスなどのげっ歯類肝細胞とは異なる機能を持つことが知られる。そこで、免疫不全マウスと肝傷害マウスを掛け合わせ、移植ヒト肝細胞を生着・増幅可能な系が構築されている。例えば、アルブミンプロモーターuPAトランスジェニックマウスとScidマウスを組み合わせ、自然発症的に起こる肝傷害を移植した成熟ヒト肝細胞で相補することで、肝細胞全体の90%以上をヒト肝細胞に置き換えたキメラマウスの安定的作出法が報告された²²⁾。B型、C型などの肝炎ウイルスはヒトやチンパンジーなどの霊長類の肝細胞にしか感染能力がないため、これらの感染実験の動物モデルを構築することは困難であった。そこで、ヒト肝細胞キメラマウスを用いた肝炎ウイルス感染系が構築され、抗ウイルス薬の解析などに使用されている^{23, 24)}。また、このキメラマウスはヒト型CYPなどの薬物代謝酵素・トランスポーターを発現しており、実験動物内でヒト型の薬物動態を予測可能な系として使用されている²⁵⁾。さらに、Ornithine transcarbamylase (OTC)欠損症などの疾患患者からのヒト肝細胞を移植したキメラマウスが作製され、病態のin vivo再現に用いられている²⁶⁾。このようなキメラマウスは、肝臓における肝細胞のみがヒト化され、他の組織・臓器の細胞はマウスのままであるため、多臓器間の関連性を解析する際に差異が生じる。肝外より供給される肝細胞に作用するマウス由来液性因子がヒト型の受容体を効率的に活性化できるかは、液性因子ごとに異なる。例えば、マウス成長ホルモンはヒト肝細胞に存在するヒト成長ホルモン受容体を活性化できないため、このキメラマウスではマウス下垂体から供給される成長ホルモンが肝臓内の肝細胞の増殖や

代謝機能を十分に誘導できず、脂肪肝を発症しやすい²⁷⁾。また、キメラマウス作製に免疫不全マウスを使用しているために、免疫反応が存在せず、炎症反応などを介する病態再現などに課題がある。

そこで、肝細胞中のマウス特異的な代謝酵素を人為的に欠損させることで、着目する代謝経路に関してヒトに類似した活性をマウスに付与するという手法が考えられる。胆汁は肝臓から分泌されたものが胆のう・小腸へと供給され、脂質の消化・吸収に重要な役割を果たしている。胆汁は、胆汁酸・リン脂質・コレステロールが主成分であるが、特に胆汁酸は肝細胞で合成され細胞膜のトランスポーターを通じて微小胆管系に排出される(1次胆汁酸)。その後、肝内胆管・胆のうを通じて小腸に排出された胆汁酸は、腸内細菌によって2次胆汁酸へと代謝された後に、食事の脂質のミセル化などを行う。その後、ごく一部は糞便などととも体外に排出されるが、ほとんどは回腸で再吸収され肝細胞へと戻る。この過程を腸肝循環と呼び、体内の胆汁酸量(胆汁酸プール)を調節する重要な機構となっている。一方で、胆汁酸は脂質のミセル化などの界面活性作用のために非常に疎水性の高い構造が含まれており、細胞への毒性などを持っている。そのため、胆管や肝細胞の異常により胆汁うっ滞を生じること、肝臓での炎症・肝硬変などの疾患につながる。家族性胆汁うっ滞症(PFIC)は、種々の遺伝子変異により肝細胞から胆汁が排泄できなくなり、肝細胞内に胆汁がうっ滞し細胞傷害を受ける常染色体潜性遺伝疾患である²⁸⁾。PFIC1型(ATP8B1)、PFIC2型(ABCB11)、PFIC3型(ABCB4)などの種類があり、肝細胞膜上の胆汁トランスポーター関連遺伝子などが原因遺伝子として報告されている²⁹⁾。例えば、ABCB11は肝細胞から胆汁内に胆汁酸を輸送する膜タンパク質であり、ABCB4はリン脂質を輸送するタンパク質である。そのため、ABCB11変異は肝細胞内に胆汁酸が蓄積し肝傷害を誘発する。また、ABCB4変異は胆汁内のリン脂質濃度の低下により胆汁の疎水性・細胞毒性が上昇し、胆汁うっ滞・肝傷害につながる。このようなPFICのモデル動物として、*Abcb4*や*Abcb11*を欠損させたマウスが作製されているが、ヒトPFIC疾患と比較して、その病態の進行が抑制されていた。その原因として考えられるのが、ヒトとマウスでの胆汁酸組成の差異である。マウス独自の胆汁酸代謝酵素であるCYP2A12、2C70の作用により、マウス胆汁内ではミユリコール酸などの親水性胆汁酸が多く含まれる。一方で、ヒトではより疎水性の胆汁酸が多く含まれ、胆汁内の胆汁酸の疎水性、つまり細胞傷害活性はヒトとマウスで大きく異なる。*Cyp2a12*、*2c70*の2重欠損マウス(CYPDKOマウス)は、このマウス独自の胆汁酸代謝経路が欠損するために、ヒトに類似した疎水性胆汁酸中心の胆汁酸プールを持つ³⁰⁾。そこで、我々の研究グループでは、このCYPDKOマウスにPFICの原因遺伝子欠損を誘導し、よりヒトに近い病態モデルの作出を行った。

この目的のため、既に存在する遺伝子改変マウスに新しい遺伝子変異を導入する方法として、アデノ随伴ウイルス(AAV)によるin vivoゲノム編集法を用いた。肝臓特異的プロモーターを

保持するAAVを用いて*SaCas9*遺伝子を発現させ、ヒトU6プロモーターを保持したAAVを用いて対象遺伝子に対するgRNAを発現させることで、肝臓特異的な遺伝子改変を迅速に誘導できるか検討を行った³¹⁾。ここで用いた変異*GFP*トランスジェニックマウスは、エクソン領域に終止コドンが挿入されており、通常の状態では蛍光を発しない。変異*GFP*遺伝子に結合するgRNAを用いて遺伝子改変を行い、挿入された終止コドンを排除することで*GFP*の蛍光を回復できるため、ゲノム編集効率の評価系として利用できる³²⁾。その結果、*SaCas9*の発現にヒトアンチトリプシンプロモーターを用いることで、効率的に肝臓でのゲノム編集が誘導できること、この時、他の臓器ではほとんどゲノム編集が起らないことを見出している(図2)。

このin vivoゲノム編集系を用いることで、PFIC3の原因遺伝子である*Abcb4*欠損マウスの迅速な作製が可能となった。AAVによる*SaCas9/Abcb4*gRNAの導入により胆汁内のリン脂質濃度が顕著に抑制され、肝細胞におけるリン脂質トランスポーターの欠失が確認された(図3)。野生型マウスで*Abcb4*を欠損させた場合(WT/*Abcb4*KO)と比較して、CYPDKOマウスで*Abcb4*を欠損させた場合(CYPDKO/*Abcb4*KO)では、血清肝傷害マーカー(AST、ALT、ALP)や肝臓での炎症・線維化関連遺伝子の発現誘導、偽胆管増生や炎症細胞浸潤、肝組織におけるコラーゲン沈着の高い誘導が見られ、ヒト胆汁酸組成によって*Abcb4*による肝傷害・線維化が顕著に増強されることが明らかとなった。肝臓における胆汁酸組成について解析した結果、*Abcb4*欠損によって肝内胆汁酸量が同様に増加する一方で、CYPDKOマウスではWTマウスと比較してより疎水性の胆汁酸で占められており、この胆汁酸のヒト型への組成変化がPFICの病態に大きな影響を与えることを見出した³¹⁾。このように、ヒト疾患をin vivoで再現するには、ヒトと実験動物の間での代謝などの種差の影響が重要と考えられた。

まとめ

05

肝臓を含めた様々な臓器の疾患の解析において、病態モデルは重要な役割を果たしている。ゲノム編集技術の確立によって、病態関連遺伝子の変異を誘導することがin vitro、in vivoの両方で容易になった。また、培養技術の進歩によって、特に臓器の3次元構造を試験管内で再現するオルガノイド培養系を用いた脂肪肝モデルの利用が進んでおり、ヒトの遺伝子多型と肝病態との関連などが解析されている³³⁾。今後、他の臓器でもこのような新しい技術を用いた病態解析系が確立されていくと予想される。

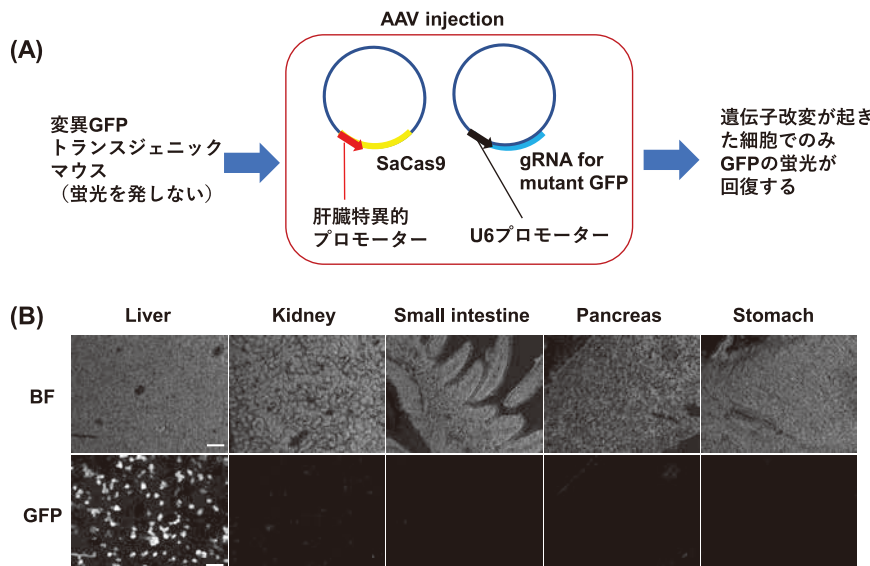


図2 変異GFPトランスジェニックマウスを用いた肝特異的ゲノム編集効率の評価
(A) AAVを用いたin vivoゲノム編集法の評価系の模式図。(B) AAV感染後の各臓器におけるGFP蛍光の回復。遺伝子改変の起こった肝臓でのみ蛍光が観察された。White line, 100 μ m. (文献31より改変)

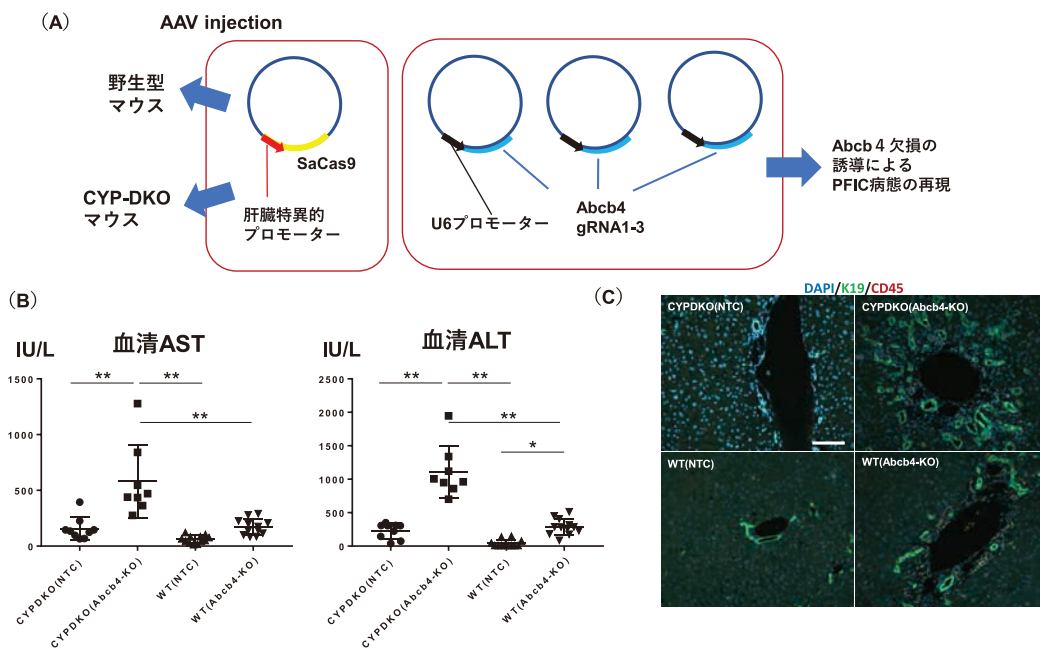


図3 AAVによるin vivoゲノム編集法を用いたPFIC3モデル動物の作出
(A) 野生型およびCYPDKOマウスにおけるAbcb4欠損誘導系の模式図。(B) 血清肝傷害マーカー (AST, ALT) のAbcb4欠損による上昇。(C) K19 (膵胆管細胞) およびCD45 (浸潤血液細胞) のCYDKOマウス肝臓におけるAbcb4欠損による誘導。White line, 100 μ m。(文獻31より改変)

参考文献

1. S. Romeo, J. Kozlitina, C. Xing, A. Pertsemlidis, D. Cox, LA. Pennacchio, E. Boerwinkle, JC. Cohen, and HH. Hobbs. Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Genet.* 2008, 40, 1461-1465.
2. CR. LaPensee, G. Lin, AL. Dent, and J. Schwartz. Deficiency of the transcriptional repressor B cell lymphoma 6 (Bcl6) is accompanied by dysregulated lipid metabolism. *PLoS One.* 2014, 9, e97090.
3. H. Chikada, K. Ida, E. Ando, Y. Inagaki, A. Sakamoto, and A.

- Kamiya. Establishment and analysis of a mouse model that regulates sex-related differences in liver drug metabolism. *Lab Invest.* 2018, 98, 1500-1511.
4. MA. Sommars, K. Ramachandran, MD. Senagolage, CR. Futtner, DM. Germain, AL. Allred, Y. Omura, IR. Bederman, and GD. Barish. Dynamic repression by BCL6 controls the genome-wide liver response to fasting and steatosis. *eLIFE.* 2019, 8, e43922
5. H. Chikada, K. Ida, Y. Nishikawa, Y. Inagaki, and A. Kamiya. Liver-specific knockout of B cell lymphoma 6 suppresses progression of non-alcoholic steatohepatitis in mice. *Sci Rep.* 2020, 10, 9704.

6. MK. Basantani, MT. Sitnick, L. Cai, DS. Brenner, NP. Gardner, JZ. Li, G. Schoiswohl, K. Yang, M. Kumari, RW. Gross, R. Zechner, and EE. Kershaw. Pnpla3/Adiponutrin deficiency in mice does not contribute to fatty liver disease or metabolic syndrome. *J Lipid Res.* 2011, 52, 318-329.
7. H. Zhang, Y. Li, C. Zhang, K. Huang, J. Zhao, S. Le, L. Jiang, H. Liu, P. Yang, X. Xiao, J. Yu, J. Wu, P. Ye, and J. Xia. B-cell lymphoma 6 alleviates nonalcoholic fatty liver disease in mice through suppression of fatty acid transporter CD36. *Cell Death Dis.* 2022, 13, 359.
8. A. Kamiya, T. Kinoshita, Y. Ito, T. Matsui, Y. Morikawa, E. Senba, K. Nakashima, T. Taga, K. Yoshida, T. Kishimoto, and A. Miyajima. Fetal liver development requires a paracrine action of oncostatin M through the gp130 signal transducer. *EMBO J.* 1999, 18, 2127-2136.
9. T. Touboul, NR. Hannan, S. Corbinaeu, A. Martinez, C. Martinet, S. Branchereau, S. Mainot, H. Strick-Marchand, R. Pedersen, J. Di Santo, A. Weber, and L. Vallier. Generation of functional hepatocytes from human embryonic stem cells under chemically defined conditions that recapitulate liver development. *Hepatology.* 2010, 51, 1754-1765.
10. A. Kamiya, S. Kakinuma, Y. Yamazaki, and H. Nakauchi. Enrichment and clonal culture of progenitor cells during mouse postnatal liver development in mice. *Gastroenterology.* 2009, 137, 1114-1126, 1126 e1111-1114.
11. A. Yanagida, K. Ito, H. Chikada, H. Nakauchi, and A. Kamiya. An in vitro expansion system for generation of human iPS cell-derived hepatic progenitor-like cells exhibiting a bipotent differentiation potential. *PLoS One.* 2013, 8, e67541.
12. K. Tsuruya, H. Chikada, K. Ida, K. Anzai, T. Kagawa, Y. Inagaki, T. Mine, and A. Kamiya. A Paracrine Mechanism Accelerating Expansion of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Hepatic Progenitor-Like Cells. *Stem Cells Dev.* 2015, 24, 1691-1702.
13. T. Kido, Y. Kou, K. Suzuki, A. Kobayashi, Y. Miura, EY. Chern, M. Tanaka, and A. Miyajima. CPM Is a Useful Cell Surface Marker to Isolate Expandable Bi-Potential Liver Progenitor Cells Derived from Human iPS Cells. *Stem Cell Reports.* 2015, 5, 508-515.
14. K. Takayama, M. Inamura, K. Kawabata, K. Katayama, M. Higuchi, K. Tashiro, A. Nonaka, F. Sakurai, T. Hayakawa, MK. Furue, and H. Mizuguchi. Efficient generation of functional hepatocytes from human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells by HNF4alpha transduction. *Mol Ther.* 2012, 20, 127-137.
15. K. Anzai, K. Tsuruya, K. Ida, T. Kagawa, Y. Inagaki, and A. Kamiya. Kruppel-like factor 15 induces the development of mature hepatocyte-like cells from hepatoblasts. *Sci Rep.* 2011, 11, 18551.
16. A. Kamiya, H. Chikada, K. Ida, E. Ando, K. Tsuruya, T. Kagawa, and Y. Inagaki. An in vitro model of polycystic liver disease using genome-edited human inducible pluripotent stem cells. *Stem Cell Res.* 2018, 32, 17-24.
17. T. Takebe, K. Sekine, M. Kimura, E. Yoshizawa, S. Ayano, M. Koido, S. Funayama, N. Nakanishi, T. Hisai, T. Kobayashi, T. Kasai, R. Kitada, A. Mori, H. Ayabe, Y. Ejiri, N. Amimoto, Y. Yamazaki, S. Ogawa, M. Ishikawa, Y. Kiyota, Y. Sato, K. Nozawa, S. Okamoto, Y. Ueno, and H. Taniguchi. Massive and Reproducible Production of Liver Buds Entirely from Human Pluripotent Stem Cells. *Cell Rep.* 2017, 21, 2661-2670.
18. HJ. Kim, G. Kim, KY. Chi, H. Kim, YJ. Jang, S. Jo, J. Lee, Y. Lee, DH. Woo, C. Han, SK. Kim, HJ. Park, and JH. Kim. Generation of multilineage liver organoids with luminal vasculature and bile ducts from human pluripotent stem cells via modulation of Notch signaling. *Stem Cell Res Ther.* 2023, 14, 19.
19. R. Ouchi, S. Togo, M. Kimura, T. Shinozawa, M. Koido, H. Koike, W. Thompson, RA. Karns, CN. Mayhew, PS. McGrath, HA. McCauley, RR. Zhang, K. Lewis, S. Hakozaiki, A. Ferguson, N. Saiki, Y. Yoneyama, I. Takeuchi, Y. Mabuchi, C. Akazawa, HY. Yoshikawa, JM. Wells, and T. Takebe. Modeling Steatohepatitis in Humans with Pluripotent Stem Cell-Derived Organoids. *Cell Metab.* 2019, 30, 374-384, e376.
20. BE. Uygun, A. Soto-Gutierrez, H. Yagi, ML. Izamis, MA. Guzzardi, C. Shulman, J. Milwid, N. Kobayashi, A. Tilles, F. Berthiaume, M. Hertl, Y. Nahmias, ML. Yarmush, and K. Uygun. Organ reengineering through development of a transplantable recellularized liver graft using decellularized liver matrix. *Nat Med.* 2010, 16, 814-820.
21. A. Collin de l'Hortet, K. Takeishi, J. Guzman-Lepe, K. Morita, A. Achreja, B. Popovic, Y. Wang, K. Handa, A. Mittal, N. Meurs, Z. Zhu, F. Weinberg, M. Salomon, IJ. Fox, CX. Deng, D. Nagraath, and A. Soto-Gutierrez. Generation of Human Fatty Livers Using Custom-Engineered Induced Pluripotent Stem Cells with Modifiable SIRT1 Metabolism. *Cell Metab.* 2019, 30, 385-401, e389.
22. C. Tateno, Y. Yoshizane, N. Saito, M. Kataoka, R. Utoh, C. Yamasaki, A. Tachibana, Y. Soeno, K. Asahina, H. Hino, T. Asahara, T. Yokoi, T. Furukawa, and K. Yoshizato. Near completely humanized liver in mice shows human-type metabolic responses to drugs. *Am J Pathol.* 2004, 165, 901-912.
23. M. Tsuge, N. Hiraga, H. Takaishi, C. Noguchi, H. Oga, M. Imamura, S. Takahashi, E. Iwao, Y. Fujimoto, H. Ochi, K. Chayama, C. Tateno, and K. Yoshizato. Infection of human hepatocyte chimeric mouse with genetically engineered hepatitis B virus. *Hepatology.* 2005, 42, 1046-1054.
24. N. Hiraga, M. Imamura, M. Tsuge, C. Noguchi, S. Takahashi, E. Iwao, Y. Fujimoto, H. Abe, T. Maekawa, H. Ochi, C. Tateno, K. Yoshizato, A. Sakai, Y. Sakai, M. Honda, S. Kaneko, T. Wakita, and K. Chayama. Infection of human hepatocyte chimeric mouse with genetically engineered hepatitis C virus and its susceptibility to interferon. *FEBS Lett.* 2007, 581, 1983-1987.
25. M. Katoh, T. Sawada, Y. Soeno, M. Nakajima, C. Tateno, K. Yoshizato, and T. Yokoi. In vivo drug metabolism model for human cytochrome P450 enzyme using chimeric mice with humanized liver. *J Pharm Sci.* 2007, 96, 428-437.
26. G. Sugahara, C. Yamasaki, A. Yanagi, S. Furukawa, Y. Ogawa, A. Fukuda, S. Enosawa, A. Umezawa, Y. Ishida, and C. Tateno. Humanized liver mouse model with transplanted human hepatocytes from patients with ornithine transcarbamylase deficiency. *J Inherit Metab Dis.* 2021, 44, 618-628.
27. C. Tateno, M. Kataoka, R. Utoh, A. Tachibana, T. Itamoto, T. Asahara, F. Miya, T. Tsunoda, and K. Yoshizato. Growth hormone-dependent pathogenesis of human hepatic steatosis in a novel mouse model bearing a human hepatocyte-repopulated liver. *Endocrinology.* 2011, 152, 1479-1491.
28. ED. Pfister, C. Droge, R. Liebe, A. Stalke, N. Buhl, A. Ballauff, T. Cantz, E. Bueltmann, J. Stindt, T. Luedde, U. Baumann, and V. Keitel. Extrahepatic manifestations of progressive familial intrahepatic cholestasis syndromes: Presentation of a case series and literature review. *Liver Int.* 2022, 42, 1084-1096.
29. LN. Bull and RJ. Thompson. Progressive Familial Intrahepatic Cholestasis. *Clin Liver Dis.* 2018, 22, 657-669.
30. A. Honda, T. Miyazaki, J. Iwamoto, T. Hirayama, Y. Morishita, T. Monma, H. Ueda, S. Mizuno, F. Sugiyama, S. Takahashi, and T. Ikegami. Regulation of bile acid metabolism in mouse models with hydrophobic bile acid composition. *J Lipid Res.* 2020, 61, 54-69.
31. K. Tsuruya, K. Yokoyama, Y. Mishima, K. Ida, T. Araki, S. Ieda, M. Ohtsuka, Y. Inagaki, A. Honda, T. Kagawa, and A. Kamiya. Abcb4-defect cholangitis mouse model with hydrophobic bile acid composition by in vivo liver-specific gene deletion. *J Lipid Res.* 2024, 65, 100616.
32. H. Miura, J. Imafuku, A. Kurosaki, M. Sato, Y. Ma, G. Zhang, A. Mizutani, K. Kamimura, CB. Gurumurthy, D. Liu, and M. Ohtsuka. Novel reporter mouse models useful for evaluating in vivo gene editing and for optimization of methods of delivering genome editing tools. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2021, 24, 325-336.
33. M. Kimura, T. Iguchi, K. Iwasawa, A. Dunn, WL. Thompson, Y. Yoneyama, P. Chaturvedi, AM. Zorn, M. Wintzinger, M. Quattrocchi, M. Watanabe-Chailland, G. Zhu, M. Fujimoto, M. Kumbaji, A. Kodaka, Y. Gindin, C. Chung, RP. Myers, GM. Subramanian, V. Hwa, and T. Takebe. En masse organoid phenotyping informs metabolic-associated genetic susceptibility to NASH. *Cell.* 2022, 185, 4216-4232, e4216.

受理日：2024年11月1日

薬物性肝障害における バイオマーカーと診断の進歩

Biomarkers and Diagnostic Advances in Drug-Induced Liver Injury

鶴谷 康太
Kota Tsuruya

東海大学医学部 内科学系消化器内科学 (講師)
Division of Gastroenterology and Hepatology, Department of Internal Medicine,
Tokai University School of Medicine (Junior Associate Professor)

加川 建弘
Tatehiro Kagawa

東海大学医学部 内科学系消化器内科学 (教授)
Division of Gastroenterology and Hepatology, Department of Internal Medicine,
Tokai University School of Medicine (Professor)

KEYWORD ▶ 薬物性肝障害

はじめに

01

薬物による臓器障害は社会的に大きな関心を集めている。特に薬物性肝障害 (Drug-Induced Liver Injury: DILI) は重篤化することもあるため、そのリスクを社会に周知するとともに、医療現場においてはDILIを見逃さないための注意が必要である。さらに、DILIは新薬開発中止や市場からの撤退の主要な原因の一つであり、創薬の視点からも非常に重要な課題である。

分子標的薬や免疫チェックポイント阻害薬などの薬剤が多様化している現状に加え、高齢化に伴う投与薬剤の増加や、健康志向の高まりに伴う健康食品の開発や個人輸入品の利用拡大により、DILIが増加することが予想されている。

DILIは現状では除外診断であり、臨床情報や検査所見を組合せてスコア化し、DILIの可能性を評価するスコアリングシステムが提唱されている。2022年に欧米で発表されたスコアリングシステムであるRevised Electronic Causality Assessment Method (RECAM)¹⁾を日本の臨床現場に合わせて改訂したRECAM-J 2023^{2, 3)}が発表され、本邦におけるDILIの診断精度

の向上が期待されている。

また、臨床現場においては血液検査で測定されるアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (aspartate aminotransferase: AST)、アラニンアミノトランスフェラーゼ (alanine aminotransferase: ALT)、ビリルビンなどがDILIにおける肝障害のバイオマーカーとして用いられている。しかしながら、感度・特異度がより高いマーカー、発症や予後予測が可能な新規マーカーが求められており、研究開発が行われている。

DILIの病態、機序

02

肝臓は薬物代謝の中心的な役割を担う臓器であり、他の臓器と比べて高濃度の薬物やその代謝産物にさらされる。DILIは、薬物やその代謝産物、服用者の免疫系が関与する複雑な過程を経て発症する。DILIは「一般型」と「特殊型」(脂肪化、腫瘍形成)に分類され、さらに、一般型は「中毒性」と「特異体質性」に分類される(図1)。「中毒性」は薬物あるいはその代謝産物が直接的に肝障

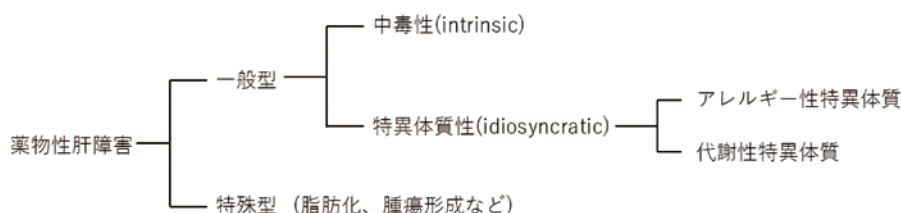


図1 薬物性肝障害の発症機序の分類

害を引き起こし、用量依存性があることが特徴である。アセトアミノフェンがその代表例であり、特に米国では一般的で予測可能なDILIとして知られているが、日本では少ない。一方、日本におけるDILIの多くは「特異体質性」であり、個々の特異な体質に基づいて発症する。「特異体質性」には、アレルギー性特異体質と代謝性特異体質が含まれる。アレルギー性特異体質では、薬物やその代謝産物が免疫原性を獲得し、細胞免疫依存性の肝障害を引き起こす。また、発疹や発熱、リンパ節の腫脹、重篤な場合にはStevens-Johnson症候群が発現することもある。この場合、薬物服用中にアレルギー反応が引き起こされ、その後1～8週間で肝障害が発症することが多い。また、過去に投与された薬物であれば、再投与後にすぐ肝障害が生じることもある。代謝性特異体質は、薬物代謝酵素や薬物トランスポーターの遺伝的要因に基づくと考えられ、発熱や好酸球増多といったアレルギー症状を伴わない。多くは8週以降に発症し、時には1年以上の長期服用後に肝障害が現れることもある。一方、特殊型としては、薬剤による脂肪性肝障害があり、代表的な薬剤としてタモキシフェン、グルココルチコイド、アミオダロン、バルプロ酸が挙げられる。また、最近では免疫チェックポイント阻害薬による自己免疫機序を介した肝障害や、免疫抑制剤や抗がん剤によるB型肝炎ウイルスの再活性化といった病態がある。

DILIにおけるバイオマーカーの探索

03

ASTやALT、ビリルビンといった従来のバイオマーカーに加え、より早期に肝障害の発症を感知でき、かつDILIに特異的で予後予測にも役立つ新たなバイオマーカーの開発が求められている。さらに、薬剤ごとにヒト白血球抗原(human leukocyte antigen:HLA)や薬物動態関連遺伝子の一塩基多型(single nucleotide polymorphism:SNP)が特定の薬剤との関連性が高いリスク因子として同定されており、これらを基にした発症予測のためのバイオマーカーの開発も期待される。

1) 液性バイオマーカー

① グルタミン酸脱水素酵素(glutamate dehydrogenase: GLDH)

GLDHは、肝臓のミトコンドリアに存在する酵素で、アミノ酸の代謝に関与している。この酵素は肝細胞が損傷を受けた際に血中に放出される。したがって、GLDHは肝臓に特異的なバイオマーカーとして注目されている。欧米の大規模なDILIコホートでは、GLDHはALTと強く相関し変動が少ないことや、半減期が短いためDILIの回復を予測する因子として有用であることが示されている⁴⁾。産学協同AMEDプロジェクトでも、GLDHはDILIの急性期と健常人の鑑別においてAUC 0.995、DILI急性期と回復期の鑑別においてAUC 0.972を示し、肝細胞障害型、胆汁うっ滞型、混合型いずれにおいても高いAUCを示し、DILI診断の優れ

たバイオマーカーと考えられる(未発表データ)。GLDHはDILIに特異的ではなく、急性肝炎などでも上昇することに注意が必要であるものの、肝細胞のミトコンドリア損傷に強く関連しており、特にミトコンドリア毒性を持つ薬剤によるDILIの早期診断に役立つ可能性がある。

② サイトケラチン18(cytokeratin 18:K18)、カスパーゼ切断K18(caspase-cleaved K18:ccK18)

K18は、上皮細胞の細胞骨格を形成する中間径フィラメントの一種であり、特に肝細胞や胆管細胞のような上皮細胞に豊富に存在している。肝臓の損傷が進行すると、肝細胞がアポトーシスやネクローシスを起こし、K18が血中に放出される。ccK18は、特にアポトーシスに関連しており、カスパーゼによってK18が切断され、この断片化されたccK18が血中で検出される。

欧米のDILIコホート研究では、DILI診断に対するK18とccK18のAUCはそれぞれ0.947および0.911であり、これらが有効なバイオマーカーとなりうることが示された。また、死亡または肝移植が必要な重症症例ではK18とccK18の比率(アポトーシスインデックス)が低いことが示され、予後予測のバイオマーカーとして期待されている⁴⁾。

③ microRNA

microRNA(miRNA)は21-25塩基程度の1本鎖RNA分子であり、真核生物において遺伝子の転写後発現調節に関与している。特にmiR-122は、肝臓特異的に発現するmiRNAであり、肝臓内のmiRNAの約70%を占める。肝細胞の損傷やストレスに関連して血液中に放出されることが示されており、DILIのバイオマーカーの候補とされる⁵⁾。特にアセトアミノフェンによる薬物性肝障害においては、ALTの上昇に先行してmiR-122が血中で増加することが示されている^{6,7)}。ただし、miR-122のレベルには個体間や同一個体内でも変動があることが報告されており^{4,8)}、これは肝臓への障害以外の生理的プロセスによる可能性が指摘されている。また、測定方法やデータ正規化の複雑さもあり、バイオマーカーとしての利用にはさらなる検討が必要である。

④ 脂質プロファイル

肝臓は脂質の合成、輸送、分解に重要な役割を担っており、肝障害が脂質プロファイルに影響を与えることが報告されている⁹⁾。産学協同AMEDプロジェクトでは、DILI症例54例において脂質プロファイルの有用性が検討された。急性期と回復期の血清を用いて行われたリピッドミクス解析では、胆汁うっ滞型DILIにおいては特定のリン脂質種(PC(31:0; 15:0/16:0), PC(33:1; 15:0/18:1, 16:0/17:1), PI(38:3), PI(38:4; 18:0/20:4))が、混合型DILIでは特定のセラミド(Cer(d34:1; d18:1/16:0), Cer(d36:1; d18:1/18:0))と ganglioside GM3のオキシ化物(GM3(d34:1)+O)が診断に有用であった¹⁰⁾。病型の違いによる変化もあり、DILIの病態を理解する上でもさらなる研究が期待される。

⑤ 胆汁酸

肝臓は胆汁酸の合成、分泌、循環に重要な役割を果たしており、肝障害では胆汁酸代謝に異常が生じ、胆汁酸の変化をきたす。161人のDILI患者を対象とした前向きコホート研究では、グリコケノデオキシコール酸(glycochenodeoxycholic acid: GCDCA)、タウロケノデオキシコール酸(taurochenodeoxycholic acid: TCDCA)、ノルコール酸(norcholeic acid: NorCA)の3つの胆汁酸が、重症患者において特に高濃度であることが確認された。重症と軽症・中等症の区別するマーカーとして、GCDCAのAUCは0.856、TCDCAは0.792、NorCAは0.753であり、これら3つを組み合わせた場合のAUCは0.895と高い予測能力を示した。この結果は、DILIの重症度評価や予後予測における新たなバイオマーカーの可能性を示唆している¹¹⁾。

2) 遺伝性バイオマーカー

DILIに関連する遺伝子がゲノムワイドに解析され、特定の薬物によるDILIが特定のHLAを有する個人において高い確率で発症することが報告されている。例えば、アモキシシリン/クラバン酸におけるHLA-DRB1*15:01やHLA-A*02:01¹²⁾、フルクロキサシンにおけるHLA-B*57:01¹³⁾、チクロピジンとHLA-A*33:01¹⁴⁾などである。ミノサイクリンにおいては薬剤誘発性自己免疫性肝炎を発症することが知られているが、その診断にHLA-B*35:02が有用であることが示されている¹⁵⁾。

DILIではないが、すでに臨床ではHIV治療薬アバカビルにおいて、特定のHLAマーカー(HLA-B57:01)の事前スクリーニングにより過敏症反応の発生率が大幅に低下したことが確認されている¹⁶⁾。HLAマーカーは陽性的中率が低いものの、陰性的中率が高いため、特定の薬物がDILIを引き起こすリスクを排除する際に有用とされる。将来的にDILIを含めた薬物治療の安全性向上に寄与する重要なマーカーであると考えられる。

臨床におけるDILI診断

04

臨床現場において、現時点では感度と特異度が共に高いDILIの診断バイオマーカーは存在しておらず、DILIは依然として除外診断である。DILIの診断でまず重要なのは、急性または慢性の肝障害において、DILIを鑑別診断に挙げることである。処方薬に加えて、民間薬、漢方薬、健康食品の摂取歴も詳細に聴取することが必要であり、服用歴が確認できた場合には、服用開始日や中止日を把握することが必要である。DILIが疑われる場合、被疑薬の添付文書や米国NIHのLiverTox®などの情報を参照し、肝障害発症のリスクを評価する。また、ウイルス性肝炎、自己免疫性肝疾患、代謝性肝疾患、アルコール性肝障害など、他の原因による肝障害を除外することが重要である。これらを踏まえ、薬剤中止後の経過観察に基づいて総合的にDILIの診断を行う。

DILI診断の標準化を目指したスコアリングシステムが提唱されており、日本では1993年に欧米で導入されたRoussel Uclaf Causality Assessment Method(RUCAM)¹⁷⁾を基に、2004年の日本消化器関連学会週間ワークショップで作成された診断基準(DDW-J 2004)^{18, 19)}が広く使用されてきた。その後、2022年に欧米でRUCAMの改訂版であるRECAMが発表されたことを受け、¹⁾、我々を含む国内15施設の肝臓専門医が議論を重ね、RECAMを日本の臨床現場に合わせて改訂したスコアリングシステムであるRECAM-J 2023が作成・発表された(表1)^{2, 3)}。RECAM-J 2023の診断基準は、①発症までの期間、②肝障害発症後の経過、③過去の肝障害の報告、④他の原因の除外、⑤その他、の5項目から成り立っている。RECAM-J 2023は、主観的要素を抑え、客観性と再現性を向上させた診断基準として期待されているが、除外診断のために必要な検査項目が多く、データ不足がスコアに影響を与える課題も残っている。今後は、非専門医でも容易に利用できるように、Web上でのスコアリングシステムの開発など、使い勝手の改善が求められている。ただし、スコアリングシステムはDILI診断の基準ではなく、DILIである可能性の重みを評価するものであり、最終的なDILIの診断は臨床医の判断に委ねられることに注意が必要である。

おわりに

05

DILIの重篤化を防ぐためには、早期にその徴候を察知し、迅速に対応することが不可欠である。特に、肝障害のリスクが高い薬剤を使用する際には、症状が現れていなくても定期的な肝機能検査を行い、潜在的な肝障害の発症を未然に防ぐ努力が求められる。また、近年の遺伝子解析技術の進展により、個々の患者に適した個別化医療がますます実現しつつあり、これにより薬剤使用前に肝毒性リスクを正確に評価することが期待されている。今後は、DILIに対するより高精度な診断法や予測バイオマーカーの開発が進み、患者の安全性がさらに向上することで、医薬品の有効性と安全性のバランスが一層改善されることが望まれる。DILIの診断と治療の進歩は、臨床医や研究者が協力して取り組むべき重要な課題であり、引き続き継続的な努力と新たな知見の蓄積が必要である。

表1 薬物性肝障害スコアリング(RECAM-J 2023)*1-5 (文献3より一部改変して転載)

カテゴリー	スコア
1.発症までの期間(日) 投与中の発症、中止後の発症のいずれにおいても1aと1bを両方計算する。	
1a. 投与開始から発症までの日数	
≤1日	-6
2-9日	3
10-60日	4
61-90日	2
>90日	0
1b. 投与中止から発症までの日数	
≤30日	0
31-60日	-1
61-90日	-2
91-120日	-4
>120日	-6
現在まだ投与中	0
(半減期≥15日の薬物では0点)	
2.肝障害発症後の経過 R≥5の場合はALT値を、R<5の場合はALPあるいはBilのいずれか高スコアとなる値を適用する*6 R値の算出には発症時の検査値を使用する	
ピーク値の50%を上回る段階で、薬物を継続していても低下する 薬物中止後、ピーク値の50%未満に低下する日数が	-6
1-30日	4
31-90日	3
91-182日	2
183-365日	1
>365日	0
50%未満に低下しない	0
182日を超えた任意の日時あるいは移植前にピークの90%超となる	-6
3.過去の肝障害の報告	
日本の添付文書、PMDAの医療用医薬品情報*7、文献に肝障害の記載がある、あるいはLiverTox category*8 AかB	3
LiverTox category CかDかE*	1
LiverTox category EかX	0
4.他の原因の除外 以下の疾患を除外する(カッコ内は除外のための条件。詳細については別表を参照)	
A型肝炎(IgM-HAV抗体陽性)	-6
B型肝炎(HBs抗原陽性、かつIgM-HBc抗体陽性)*9	-6
C型肝炎(HCV抗体陽性、かつHCV-RNA陽性)*9	-6
E型肝炎(IgA-HEV抗体陽性)	-6
サイトメガロウイルス(IgM-CMV抗体陽性)*10	-6
EBウイルス(IgM-VCA抗体陽性)*10	-6
単純ヘルペスウイルス(IgM-HSV抗体陽性)*10	-6
アルコール(60g/日以上以上の飲酒量、AST:ALT ≥2、かつAST≤500)	-6
肝・胆道系疾患(胆道閉塞、ないし肝の50%以上を占める悪性腫瘍)	-6
自己免疫性肝炎(IgG高値、抗核抗体陽性等)	-6
虚血性肝障害、急性うつ血性肝障害(病歴あり)	-2
敗血症による胆汁うっ滞(病歴あり)	-2
5.その他	
既往歴の確認	
既往に被疑薬の服用歴なし	0
既往に被疑薬の服用歴があるが黄疸を伴う肝障害なし	0
既往に被疑薬の服用歴あり黄疸を伴う肝障害を発症	1
偶発的な再投与*10	
なし	0
あり:AST、ALT2-3xULN and/or ALP1-2x ULN	0
あり:同じ病型、60日未満に発症、AST、ALT>3xULN and/or ALP>2x ULN	6
あり:AST、ALT<2xULN and ALP正常	-3
肝生検	
施行せず	0
薬物性肝障害が疑われる	0
特定の型の薬物性肝障害と一致	1
他の疾患と診断できる	-6
DIHS(drug-induced hypersensitivity syndrome), Stevens-Johnson syndrome	
なし、あるいは情報なし	0
あり	1

≥8	非常に可能性が高い(Definite/Highly likely)
4~7	可能性高い(Probable)
-3~-3	可能性が残る(Possible)
≤-4	可能性低い(Unlikely)

*1 RECAM-J 2023は薬物性肝障害(DILI)の可能性を評価するスコアリングシステムである。DILIか否かを判定する基準ではない。

*2 RECAM-J 2023は以下の値をとるDILIを想定している。
ALT≥5xULN
ALP≥2xULN
ALT>3xULN、かつ総ビリルビン>2xULN
これより軽度の肝障害を呈するDILIに対するRECAM-J 2023の妥当性は今後の検討課題である。

*3 慢性肝障害が存在し、ベースライン値が異常高値の場合には、ULNをベースライン値に置き換えて評価する。

*4 アセトアミノフェンによる中毒性DILI、またタモキシフェン等による特殊型DILIに対してRECAM-J 2023を用いるべきではない。また、免疫チェックポイント阻害薬、漢方薬・健康食品・自然食品・サプリメントによるDILIに対するRECAM-J 2023の妥当性は今後の検討課題である。

*5 小児例ではALPに代わってγ-GTを使用する。

*6 $R = (ALT/ULN) \div (ALP/ULN)$
 $R \geq 5$:hepatocellular
 $2 < R < 5$:mixed
 $R \leq 2$:cholestatic

*7 PMDAの医療用医薬品情報検索: <https://www.pmda.go.jp/PmdaSearch/iyakuSearch/>

*8 LiverTox: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK547852/>

*9 HBV、HCVの慢性感染例にDILIが合併することがある。またC型急性肝炎ではHCV抗体が陰性となる場合がある。

*10 サイトメガロウイルス、EBウイルス、単純ヘルペスウイルスの抗体を測定していない場合、スコアを0点とする。

*11 被疑薬の意図的な再投与は行うべきではない。偶発的な再投与が行われた場合、ベースライン値が基準値上限を超えていた場合にはULNに代わってベースライン値を用いる。

参考文献

- P. H. Hayashi, M. I. Lucena, R. J. Fontana, E. S. Björnsson, G. P. Aithal, H. Barnhart, A. Gonzalez-Jimenez, Q. Yang, J. Gu, R. J. Andrade, and J. H. Hoofnagle. A revised electronic version of RUCAM for the diagnosis of DILI. *Hepatology*. 2022, 76, 1, 18-31.
- A. Tanaka, K. Tsuji, Y. Komiyama, K. Tsuruya, K. Kakisaka, A. Tsutsui, K. Ichimoto, M. Ueno, Y. Okazaki, H. Kamimura, A. Takai, N. Yamashiki, T. Ito, M. Watanabe, M. Abe, K. Harada, and T. Kagawa. RECAM-J 2023-Validation and development of the Japanese version of RECAM for the diagnosis of drug-induced liver injury. *Hepatol Res*. 2024, 54, 6, 503-512.
- 田中 篤. 薬物性肝障害スコアリングシステム -RECAM-J 2023-. 肝臓. 2024, 65, 10, 482-490.
- R. J. Church, G. A. Kullak-Ublick, J. Aubrecht, H. L. Bonkovsky, N. Chalasani, R. J. Fontana, J. C. Goepfert, F. Hackman, N. M. P. King, S. Kirby, P. Kirby, J. Marcinak, S. Ormarsdottir, S. J. Schomaker, I. Schuppe-Koistinen, F. Wolenski, N. Arber, M. Merz, J.-M. Sauer, R. J. Andrade, F. v. Bömmel, T. Poynard, and P. B. Watkins. Candidate biomarkers for the diagnosis and prognosis of drug-induced liver injury: An international collaborative effort. *Hepatology*. 2019, 69, 2, 760-773.
- L. S. Howell, L. Ireland, B. K. Park, and C. E. Goldring. MiR-122 and other microRNAs as potential circulating biomarkers of drug-induced liver injury. *Expert Rev Mol Diagn*. 2018, 18, 1, 47-54.
- K. Wang, S. Zhang, B. Marzolf, P. Troisch, A. Brightman, Z. Hu, L. E. Hood, and D. J. Galas. Circulating microRNAs, potential biomarkers for drug-induced liver injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106, 11, 4402-4407.
- P. Thulin, G. Nordahl, M. Gry, G. Yimer, E. Aklillu, E. Makonnen, G. Aderaye, L. Lindquist, C. M. Mattsson, B. Ekblom, D. J. Antoine, B. K. Park, S. Linder, A. H. Harrill, P. B. Watkins, B. Glinghammar, and I. Schuppe-Koistinen. Keratin-18 and microRNA-122 complement alanine aminotransferase as novel safety biomarkers for drug-induced liver injury in two human cohorts. *Liver Int*. 2014, 34, 3, 367-378.
- J. Vogt, D. Sheinson, P. Katavolos, H. Irimagawa, M. Tseng, K. R. Alatsis, and W. R. Proctor. Variance component analysis of circulating miR-122 in serum from healthy human volunteers. *PLoS One*. 2019, 14, 7, e0220406.
- M. G. Wang, S. Q. Wu, M. M. Zhang, and J. Q. He. Plasma metabolomic and lipidomic alterations associated with anti-tuberculosis drug-induced liver injury. *Front Pharmacol*. 2022, 13, 1044808.
- K. Saito, T. Kagawa, K. Tsuji, Y. Kumagai, K. Sato, S. Sakisaka, N. Sakamoto, M. Aiso, S. Hirose, N. Mori, R. Tanaka, T. Uraoka, K. Takata, K. Ogawa, K. Mori, M. Sato, T. Nishiya, K. Takamatsu, N. Arakawa, T. Izumi, Y. Ohno, Y. Saito, and H. Takikawa. Plasma Lipid Profiling of Three Types of Drug-Induced Liver Injury in Japanese Patients: A Preliminary Study. *Metabolites*. 2020, 10, 9, 355.
- Z. Xie, L. Zhang, E. Chen, J. Lu, L. Xiao, Q. Liu, D. Zhu, F. Zhang, X. Xu, and L. Li. Targeted Metabolomics Analysis of Bile Acids in Patients with Idiosyncratic Drug-Induced Liver Injury. *Metabolites*. 2021, 11, 12, 852.
- M. I. Lucena, M. Molokhia, Y. Shen, T. J. Urban, G. P. Aithal, R. J. Andrade, C. P. Day, F. Ruiz-Cabello, P. T. Donaldson, C. Stephens, M. Pirmohamed, M. Romero-Gomez, J. M. Navarro, R. J. Fontana, M. Miller, M. Groome, E. Bondon-Guitton, A. Conforti, B. H. C. Stricker, A. Carvajal, L. Ibanez, Q. Y. Yue, M. Eichelbaum, A. Floratos, I. Pe'er, M. J. Daly, D. B. Goldstein, J. F. Dillon, M. R. Nelson, P. B. Watkins, and A. K. Daly. Susceptibility to amoxicillin-clavulanate-induced liver injury is influenced by multiple HLA class I and II alleles. *Gastroenterology*. 2011, 141, 1, 338-347.
- M. M. Monshi, L. Faulkner, A. Gibson, R. E. Jenkins, J. Farrell, C. J. Earnshaw, A. Alfrevic, K. Cederbrant, A. K. Daly, N. French, M. Pirmohamed, B. K. Park, and D. J. Naisbitt. Human leukocyte antigen (HLA)-B*57:01-restricted activation of drug-specific T cells provides the immunological basis for flucloxacillin-induced liver injury. *Hepatology*. 2013, 57, 2, 727-739.
- P. Nicoletti, G. P. Aithal, E. S. Björnsson, et al. Association of Liver Injury From Specific Drugs, or Groups of Drugs, With Polymorphisms in HLA and Other Genes in a Genome-Wide Association Study. *Gastroenterology*. 2017, 152, 5, 1078-1089.
- T. J. Urban, P. Nicoletti, N. Chalasani, J. Serrano, A. Stolz, A. K. Daly, G. P. Aithal, J. Dillon, V. Navarro, Navarro, J. Navarro, J. Odin, H. Barnhart, D. Ostrov, N. Long, E. T. Cirulli, P. B. Watkins, and R. J. Fontana. Minocycline hepatotoxicity: Clinical characterization and identification of HLA-B*35:02 as a risk factor. *J Hepatol*. 2017, 67, 1, 137-144.
- S. Mallal, E. Phillips, G. Carosi, J. M. Molina, C. Workman, J. Tomazic, E. Jägel-Guedes, S. Rugina, O. Kozyrev, J. F. Cid, P. Hay, D. Nolan, S. Hughes, A. Hughes, S. Ryan, N. Fitch, D. Thorborn, and A. Benbow. HLA-B*5701 screening for hypersensitivity to abacavir. *N Engl J Med*. 2008, 358, 6, 568-579.
- G. Danan and C. Benichou. Causality assessment of adverse reactions to drugs--I. A novel method based on the conclusions of international consensus meetings: application to drug-induced liver injuries. *J Clin Epidemiol*. 1993, 46, 11, 1323-1330.
- 滝川 一, 恩地 森一, 高森 頼雪, 村田 洋介, 谷口 英明, 伊藤 正, 渡辺 真彰, 綾田 穰, 前田 直人, 野本 実, 村田 浩之, 大森 茂, 久持 顕子, 炭田 友宜. DDW-J 2004 ワークショップ薬物性肝障害診断基準の提案. 肝臓. 2005, 46, 2, 85-90.
- H. Takikawa and M. Onji. A proposal of the diagnostic scale of drug-induced liver injury. *Hepatol Res*. 2005, 32, 4, 250-251.

受理日：2024年11月7日

薬物性肝障害の予測を目指した in vitro評価系の構築

Construction of in vitro system for predicting drug-induced liver injury

竹村 晃典
Akinori Takemura

千葉大学大学院 薬学研究院 生物薬剤学研究室(助教)
Laboratory of Biopharmaceutics, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Chiba University (Assistant Professor)

KEYWORD ▶

薬物性肝障害

in vitro評価

共培養

肝再生

はじめに

01

薬物性肝障害(Drug-induced liver injury:DILI)は、薬物が安全性の問題によって開発中止となるだけでなく上市後の市場撤退においても主たる原因の1つとなる。その要因として、DILIの多くは用量や薬効とは無関係に(特異体質的に)発症するため、実験動物を用いた前臨床試験での肝毒性検出が困難であることが挙げられる。そのため、DILI予測には様々な細胞種を用いたin vitro肝毒性評価が実施され、ある一定の精度でその予測は可能になりつつあるが、いまだ不十分である。その要因として、i)DILI発症機序が複雑であり、重要な評価ポイントを見落としている可能性、ii)評価に用いる細胞種と生体内肝臓の差異、が考えられる。これらを改善するには、動物や高次な細胞系を用いたDILI発症の詳細な機序の解明ならびに生体内の肝臓を適切に表現するin vitro評価系の開発の両方を進め、構築した評価系の妥

当性を検証することが必須である(図1)。本総説では、これらのポイントについて著者の研究成果と他の研究グループの最新の情報を交えて概説する。

DILI予測評価の取り組み

02

これまでにDILIの予測を指向した様々なin vitro評価系が報告されており、過去10年間ににおける海外メガファーマの取り組みについては著者が以前執筆した総説を参考にさせていただいた¹⁾。簡潔にまとめると、i)従来は単一の評価系で試験を進めていたが、DILI発症の複雑さを考慮し、複数の評価系から得られた結果を適切に解析してDILI判定することが一般的となったこと、ii)実施する評価項目の絞り込みが進み、反応性代謝物の生成に着目した評価、ミトコンドリア障害に着目した評価、胆汁うっ滞に

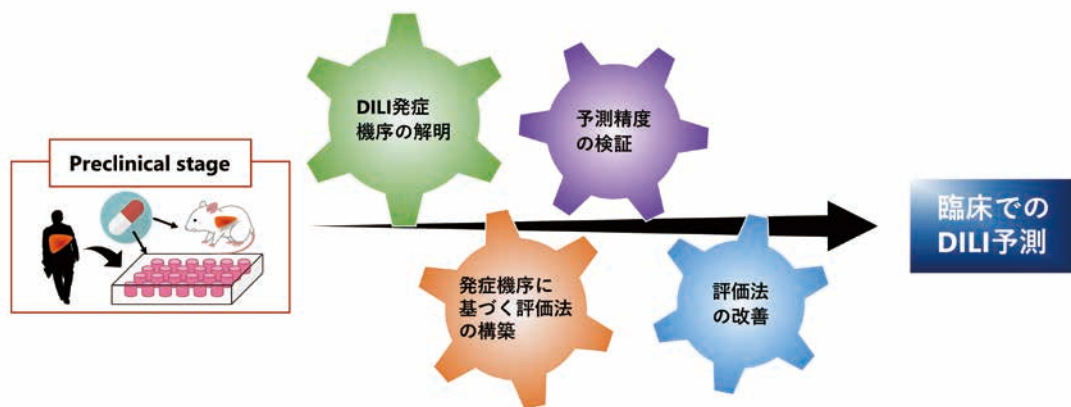


図1 薬物性肝障害予測に向けた戦略

関わるトランスポーターの阻害能評価が多く実施されたこと、iii) in vitro毒性評価のみならず、薬物動態パラメーターや化合物の物理化学的特性なども加味した解析も盛んに行われていること、がDILI予測の潮流となっている。また、国内の製薬企業においても、近年はDILI予測を目的としたin vitro評価系の構築がなされており(反応性代謝物²⁾、ミトコンドリア毒性³⁾、胆汁うっ滞毒性^{4, 5)}、国内外問わず同じ認識となっている。著者らもDILIRISKに依拠して薬物を抽出し、独自に構築したミトコンドリア毒性評価系ならびに胆汁うっ滞毒性評価系で取得したin vitroデータを基に、加点法や人工ニューラルネットワークにてアルゴリズムを作成することで、DILIRISKを予測する方法を報告している⁶⁾。ここで実施した評価系の一部はスループット性がよく、評価系の安定性なども加味された中で受託試験としても広く採用されている。一方で、これら手法の予測精度は概ね感度・特異度が80%前後であり、DILI予測の精度をさらに向上させるためには新たな評価系を構築する必要がある。その点について、著者らが現状不十分であると考えた毒性機序、その中でもミトコンドリア毒性について、i) 毒性機序に基づいた評価系の構築⁷⁾、ii) 使用する細胞株と新規培養基材を用いた薬物代謝を加味したミトコンドリア毒性評価系の構築^{8, 9)}、について紹介をさせていただきたい。

ミトコンドリア膜透過性遷移に着目した評価系の構築

03

肝臓はエネルギー産生・貯蔵において非常に重要な臓器であり、その中でミトコンドリアは大きな寄与を示す。このため、古くからミトコンドリア毒性とDILI発症の関係については問題提起がなされており、米国では多くの薬物がミトコンドリア毒性を有すると添付文書の黒枠警告に記載されている¹⁰⁾。

現状のミトコンドリア毒性評価は、i) 培地中の糖源をグルコースからガラクトースに置き換えた培地にて薬物毒性を評価し、グルコースならびにガラクトース培地条件下で得られた値の比からミトコンドリア毒性を評価する手法(glucose/galactose assay)、ii) 蛍光試薬を用いてミトコンドリア膜電位評価やreactive oxygen species (ROS)を検出する手法、iii) Agilent社が販売している細胞外フラックスアナライザーを用いて酸素消費量を測定する手法、によって行われている。比較的簡便に行えるglucose/galactose assayについて当研究室で検証したところ、ミトコンドリアの呼吸鎖阻害や酸化ストレスに起因した毒性を検出することは可能であったが、その他の毒性機序については見落とす可能性があった¹¹⁾。ミトコンドリア膜透過性遷移(mitochondria permeability transition:MPT)がその1つである。MPTとは、ミトコンドリアの内膜と外膜を貫く孔が形成され、制御なく物質が流出入する現象である。MPTは、膜電位の消失によってATP産生を著しく低下させ、また、ミトコンドリアからのアポトーシス誘導因子の放出を介して細胞死を誘導する。劇症肝炎を引き起こす医薬品化合物の一部にもMPT誘導能が

報告されている¹²⁾。従来のMPT評価法としては、げっ歯類の肝臓より単離した新鮮ミトコンドリアを用いる方法が存在する。しかし、特に代謝物の影響を加味できる培養細胞での評価系は未確立であり、MPTがDILIRISKの予測に与える影響は現時点で不明である。当研究室では実験動物を用いた解析により、薬物処置時のMPT感受性増強には虚血再灌流によるミトコンドリアでのROS発生が重要であることを見出し、このような状況を培養細胞系にて模倣することで、MPTに起因した肝細胞毒性を検出できる系の構築に成功した⁷⁾。この系での評価は十数化合物に留まっており、DILI予測能の改善にどこまで影響を与えるか不明であるが、このような試みは継続していきたいと考えている。

薬物代謝を加味したミトコンドリア毒性評価系の構築

04

肝毒性の発症機序の1つとしてミトコンドリア毒性が着目されているが、ミトコンドリアは様々な臓器の実質細胞においてエネルギー産生に関わる非常に重要なオルガネラであり、肝臓は心臓や腎臓よりもミトコンドリア含量が少ないことが知られている。ミトコンドリア毒性のみを持つだけでは肝毒性につながるとは言えず、著者らは肝臓特有の機能が関わっていると考え、まずは肝細胞で産生された代謝物によるミトコンドリア毒性の可能性を検証することにした。第2章に記載したとおり、これまでも代謝活性化によるDILI発症は広く受け入れられていた。例えば、acetaminophenによるDILI発症機序は、cytochrome P450 (CYP) 2E1によって代謝された反応性代謝物がミトコンドリア毒性を誘発すると考えられている。しかしながら、従来のglucose/galactose assayは肝がん由来細胞株であるHepG2細胞が主として使用されるため、薬物代謝の寄与を適切に評価できていない。この問題を解決するために、HepG2細胞に主要な薬物代謝酵素を遺伝子導入した細胞の作製を試みた。遺伝子導入は一般的にアデノウィルスなどが用いられるが、複数の遺伝子を同時に導入することが困難であることや、一過性の発現系に留まりスループット性や評価の安定性が低いといった問題がある。そこで、著者らは鳥取大学香月教授らのグループが開発した人工染色体ベクターを用いてHepG2細胞に主要な薬物代謝酵素(CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4)を発現させ、TC-Hep細胞を作製した⁸⁾。被験物質は、未変化体が強い毒性を示す呼吸鎖阻害剤のrotenoneを使った。TC-Hep細胞とglucose/galactose assayを組み合わせることで、HepG2細胞をガラクトース培養した条件に比べてrotenoneの毒性感受性が低下することを確認した。そこで、この条件にて新薬としての開発が中止された化合物の毒性評価を行うこととした。CP-724714は、臨床試験にて肝障害マーカーの上昇を認めて開発中止となり、in silicoの解析から代謝物がミトコンドリア毒性を示す可能性が示唆された化合物である。そこで、HepG2細胞ならびにTC-Hep細胞を用いて解析したところ、TC-Hep細胞においてグル

コース培地条件下と比較してガラクトース培地条件下で毒性感受性が高まった。CP-724714と同様の理由で開発中止に至った他の4つの化合物(ADX-10059, CP-456773, TAK-875, zamifenacin)についても本条件下での評価を実施したところ、zamifenacinにおいて同様の結果を得ることができた。従来法では検出できなかった毒性がわかり、肝毒性発現機序が不明であった化合物の推定も行えたことから、本系は新たな肝毒性in vitro評価法の1つとなりうる可能性が示された。一方、本系は強制発現させた薬物代謝酵素の寄与は評価できるものの、その他の薬物代謝酵素の寄与は考慮されておらず、この点については初代ヒト肝細胞を用いた評価系の構築が望ましい。凍結初代ヒト肝細胞は、肝毒性in vitro評価のゴールドスタンダードであるが、凍結によってミトコンドリアが損傷を受けてその機能が低下しており、ガラクトース培養が困難である¹³⁾。また、従来の初代肝細胞培養法の問題点として酸素供給性が挙げられる。肝細胞はミトコンドリアによる酸素消費が盛んであるが、従来用いられているポリスチレン製の細胞培養用プレートは酸素透過性が低く、気液界面からの酸素供給に限られる。したがって、その供給スピードでは肝細胞の酸素要求量に到達することができず、肝細胞が嫌気条件で培養されることになる¹⁴⁾。これを改善するため、酸素透過性基材を用いたプレートの作製が行われており、その多くがポリジメチルシロキサン製である。しかし、ポリジメチルシロキサンは一般的なインキュベーターの温度条件下ではゴム状の性質を示し、低分子化合物がその隙間に入り込んで収着することが知られており、薬物の評価には不向きであった。これを改善するプレートとして、低収着性・高酸素透過性素材であるポリメチルペンテンで作製されたInnoCellプレート(三井化学株式会社)が開発されている。著者が本プレート上で初代ラット肝細胞を培養すると、乳酸産生量が低下するだけでなく、細胞内のTCA回路の中間代謝物量が上昇し、ミトコンドリア機能の賦活化が確認できた⁹⁾。また、それだけでなく、薬物代謝酵素についても遺伝子発現量ならびにその活性が増強することも確認した。この培養条件下で、反応性代謝物による毒性感受性ならびにミトコンドリア毒性感受性について評価すると、その毒性感受性が増強し、一部の化合物ではCYP阻害剤を前処置することで、その毒性が減弱することも確認した。本検討は初代ラット肝細胞での取り組みに留まっているが、初代ヒト肝細胞の培養条件を様々な点で見直し、生体に近い肝細胞の状態を模倣することで、適切な肝毒性in vitro評価につながると考えている。

胆汁うっ滞に関わるin vitro評価系

05

胆汁うっ滞型肝障害には様々な疾患が知られ、その1つに進行性家族性肝内胆汁うっ滞症(Progressive familial intrahepatic cholestasis:PFIC)がある。PFICの発症には、肝細胞の毛細胆管膜に発現し、胆汁酸の輸送を担うトランスポー

ター(bile salt export pump:BSEP)の遺伝子変異が関与していることがわかっている。この発見を契機とし、胆汁うっ滞型DILI発症機序の1つとして薬物によるBSEP阻害が注目されている。この評価に用いられるBSEP発現膜ベシクルは、簡便に実施できる有用なツールではあるが、いくつかの問題点がある。その1つは薬物代謝の影響が考慮されていないことである。重篤なDILI発症が認められて市場撤退に陥ったtroglitazoneは、その主たる代謝物の硫酸抱合体が未変化体よりも強いBSEP阻害能を有しており¹⁵⁾、このような薬物については過小評価する可能性がある。さらに、BSEP阻害により毒性発症に至るかどうかも不明である点も問題として挙げられる。そこで著者らは、胆汁酸の方向性輸送を有する培養肝細胞(サンドイッチ培養した初代肝細胞やHepaRG細胞)を用いて、胆汁うっ滞型DILIの原因となる肝細胞内への胆汁酸蓄積に伴う細胞毒性を検出するin vitro評価系の構築に取り組んできた⁶⁾。既に報告した論文内容を簡潔に記載する。胆汁酸の方向性輸送を有する肝細胞に至適量の胆汁酸と薬物を共曝露し、細胞内に蓄積した胆汁酸に起因した毒性を評価する系(BAtox)を構築した。しかし、BAtoxは一部の薬物に対して、初代ヒト肝細胞のロット間差の影響を強く受けることが明らかとなった¹⁶⁾。薬物代謝能などのロット間差が生じにくい細胞リソースと組み合わせれば、より安定した評価を継続的に実施できるようになるかもしれない。現在もこの系の改善に向けた評価を実施しており、その詳細は成果がまとまり次第みなさまと共有できればと考えている。

胆汁うっ滞型DILIの評価に関しては、我々だけでなく他の研究グループも細胞ベースの評価系構築が進められている。その1例として、武田薬品工業のグループから報告されたPXB-cells(株式会社フェニックスバイオ)と蛍光基質を用いた評価が挙げられる⁴⁾。PXB-cellsは、凍結することなくユーザーの元に提供される新鮮初代ヒト肝細胞であり、同一ロット由来の肝細胞を使用し続けられるメリットがある。この細胞と凍結初代ヒト肝細胞をサンドイッチ培養し、胆汁酸の蛍光アナログであるcholy-L-lysyl-fluorescein (CLF)を添加して毛細胆管の形成度合を評価すると、PXB-cellsの方が凍結初代ヒト肝細胞よりも顕著に毛細胆管が形成されることが確認された。また、BSEP阻害薬の陽性化合物であるcyclosporin Aを処置してCLFの排泄阻害を評価すると、PXB-cellsの方がより低濃度での阻害が見られることや、凍結初代ヒト肝細胞で見られたロット間のバラつきが軽減されることも確認された。この系に対して45種類の薬物を用いた評価を実施すると、胆汁うっ滞・混合型の薬物についてはより低濃度でCLF排泄が阻害されており、各薬物について最高血中濃度との比を算出し、カットオフ値を20に設定したところ、胆汁うっ滞・混合型に分類される薬物のうち90%以上の化合物が陽性と判定された。また、武田薬品工業のグループはiPS細胞より作製した肝オルガノイドを用いた検討も行っている¹⁷⁾。CYP2C9の野生型・一塩基多型を有する肝オルガノイドをそれぞれ作製し、その遺伝子変異が原因でDILIが発症するとされているbosentanを用いた胆汁うっ滞毒性評価もなされている。新たな実験ツール

が開発されることで、これまで未解明であった毒性発現機序の解析が進み、それを基に適切な評価系が構築され、DILI予測の精度の向上につながることを期待する。

高次な肝毒性in vitro評価系の現状

06

著者らの研究成果も含め、これまでに述べてきた評価系の多くは短期毒性(薬物曝露から24時間以内)を対象としている。しかし、臨床でDILI発症に至るのは薬物の服用から数日後、長い場合は数か月後のことであるから、長期毒性を示す化合物についても適切に評価する必要がある。初代肝細胞は培養に伴い肝細胞機能が急速に低下するため、長期培養が可能なスフェロイド培養法が開発され毒性評価に応用されてきた。実際に初代ヒト肝細胞を用いて作製したスフェロイドに被験化合物123種を14日間曝露すると、感度69%・特異度100%でその毒性を検出できただけでなく、動物の種差を反映した毒性の評価も可能となった¹⁸⁾。しかしながら、引用文献の中では他の培養法との直接的な比較は行われておらず、既報のデータを基に感度・特異度が向上したことを示したに過ぎない。この点について、海外のメガファーマが共同で行った検討が参考になる。この検討では、スフェロイド培養およびマトリゲルを用いたサンドイッチ培養条件下で長期培養時の各種評価を実施した。各条件において薬物代謝酵素の遺伝子発現やその活性を評価すると、概ねスフェロイド条件下で上昇していることが確認された。また、毒性評価についても、acetaminophen、diclofenac、troglitazone、fialuridineといった臨床で重篤なDILIを発症する化合物が、臨床の最高血中濃度の10倍以下の濃度で毒性が検出された¹⁹⁾。このように、適切な比較対象を設定しながら長期培養(長期曝露)を行うこと、また、スフェロイド化によって肝細胞機能を維持することが毒性感受性の増強につながることを示された。

これまでの評価系は肝細胞単独での評価に留まっているが、一部の薬物は様々な経路を介して自然免疫もしくは獲得免疫を活性化し、DILIを発症させることがある。国内であれば金沢大学・名古屋大学で研究室を主宰されていた横井毅先生のグループ、海外ではトロント大学のDr. Jack Uetrechtのグループが多くのDILIモデルを作出しており、詳細についてはそれぞれの総説を参照いただきたい^{20, 21)}。このように、in vivoで見出された機序を基にin vitroで模倣する試みもなされ、その1つとして薬物処置後に肝細胞から放出されるdamage-associated molecular patterns (DAMPs)に着目した評価系も構築されてきた。大阪薬科大学の加藤隆児教授のグループは、スフェロイド培養により薬物代謝酵素活性などの肝細胞機能が向上するヒト肝がん由来細胞(functional liver cell-4:FLC-4)に被験薬を曝露し、その培養上清を急性単球性白血病由来のヒト単球株であるTHP-1細胞に添加すると、IL-1 β の産生が顕著に上昇することをamodiaquine、niraparib、carbamazepineなどで見出

した^{22, 23)}。特にcarbamazepineの評価ではCYPによる代謝物がインフラマソームを活性化させる可能性を示しており、炎症反応に起因した評価を簡便に行えると思われた。肝臓には実質細胞である肝細胞のほかに類洞内皮細胞や星細胞などの非実質細胞が存在しており、これらを共培養した検討も進められている。In sphero社の3D human liver microtissues (hLiMT)を用いた検討は²⁴⁾、DILI陽性化合物を2週間曝露した際の毒性検出感度が向上することを示している。しかし、その比較対象は2次元培養された初代ヒト肝細胞に薬物を2日間曝露した条件が設定されており、この毒性感受性がどこに起因したのかは不明である。この疑問点への回答をアストラゼネカ社のグループがacetaminophenを代表薬として解析している²⁵⁾。非実質細胞と共培養した条件ではacetaminophenによる毒性感受性が低下したこと、また、生成された代謝物や薬物代謝酵素の遺伝子発現解析の結果より、反応性代謝物が生成しにくい条件に起因して本現象が生じたと考えられた。より高次な系としては、iPS細胞由来の肝オルガノイドや生体模倣システム(microphysiological system:MPS)の利用などが挙げられる。このような複雑なin vitro評価モデル(complex in vitro model:CIVM)は非常に高価であり、スループット性にも欠けているため、CIVMの開発者はユーザーニーズを十分にくみ取りながらそのモデルの有用性を適切に主張し、従来の簡便な評価系(2次元培養や非細胞系)で評価すべき事項と区別する必要がある。ユーザー側も正しく情報を解釈するために、i)比較対象の評価系は適切か、ii)流路系が存在する場合は流路の体積を加味した評価になっているか、iii)被験化合物で用いられている化合物が恣意的に選択されていないか、などを読み取りながら評価系を構築することが必要だと考える。特にiii)の化合物選択については、開発者とユーザーの両者にとって、より多くの化合物を評価してあることが望ましいが、その限度は存在する。本年公開された論文にて、専門家によってDILI陽性化合物・陰性化合物の代表薬として10化合物ずつ選択されたことから²⁶⁾、この基準のもとで評価を行い、それを基に議論することが必要だと考えられる。

肝再生過程に着目した研究

07

上述してきた評価系はシンプルな評価系からCIVMまで様々なあるが、それらのほとんどは肝細胞死もしくは肝細胞内での機能異常をとらえる評価系となっている。一方、臨床の現場では、致死性のDILIに至る症例としてHy's lawの基準を満たすような血漿マーカーの値(高ALT値、高ビリルビン値)を示し、被疑薬の服用を休止しても、ALT値は低下するがビリルビン値は高値を示し続ける症例が存在する²⁷⁾。このことから、薬物により肝機能の回復(肝再生)が遅延し、むしろ増悪していると想定できる。そこで著者らは、“薬物による肝再生プロセスの阻害が、肝障害の増悪・重篤化を引き起こし、それが重篤なDILIにつながっているのでは

ないか”と仮説を立てた。ビリルビン値が高値を示していたことから、胆汁排泄の起点となる毛細胆管構造の形成・伸長に着目して検討を進め、重篤なDILIを発症し、国内において緊急安全性情報が発出されたbenzbromarone²⁷⁾をモデル薬物として解析を行った。サンドイッチ培養したマウス肝細胞にbenzbromaroneを曝露すると毛細胆管構造の形成が著しく抑制され、著者らが独自に作製したマウスのin vivoモデルでは、benzbromarone処置によってALTや総ビリルビン値が上昇することを確認した²⁸⁾。このことから、薬物による毛細胆管構造の形成・伸長の抑制が肝再生過程を介して肝障害に影響を与えることを示すことができた。しかし、この毛細胆管伸長は肝細胞だけで起こる肝再生プロセスを観察しているにすぎない。一般的に肝再生プロセスは障害時に惹起される炎症反応により進行することが知られている。活性化した炎症関連細胞が傷害を受けた細胞を除去し、その後放出される増殖因子により肝細胞の増殖が進行する。この点について、実験動物で肝障害を引き起こすことができるacetaminophenを用いた研究が盛んに行われ、Yangらのグループは好中球に着目した検討を行っている²⁹⁾。一般的に、障害部位に遊走された好中球はプロテアーゼやROSにより障害の増悪に関与することが知られているが、炎症反応を収束させる液成因子を放出することや、組織修復の機能があることなども報告されている。本仮説を検証するために、acetaminophen投与6時間後に好中球の中和抗体を投与し、72時間後の血清マーカーを測定したところ、中和抗体投与群でALTが高値を示し、壊死した領域が多く残存することが示された。また、一般的に肝再生能は年齢を重ねるに伴いその能力が低下する。東京大学医科学研究所の谷水直樹准教授のグループは、若齢マウスと老齢マウスにacetaminophenを投与すると、48時間後までの生存率が老齢マウスで顕著に低下することを見出している³⁰⁾。その要因として、遊走するマクロファージ数が減少し、傷害を受けた肝細胞が残存することで、肝臓の修復が遅延することが提唱されている。現状wound-healing processを反映できるin vitro評価系は存在せず、この現象をin vitroで評価することは難しいが、今後の細胞培養技術の発展により可能になることを期待している。

おわりに

08

DILI発症のメカニズムの解明とそれに基づくin vitro評価系の構築は古くから行われているが、ここ数年の研究に着目してもその進歩は著しい。本総説では触れなかったが、大量のデータを基にしたin silicoによるDILI予測も盛んに実施され、それに伴いどこが重要なポイントなのか判別できない状況になりつつある。これを打破するためには、毒性研究者だけでなく、医学・工学・データサイエンスなど様々な分野の研究者が協力して適切な解析を行うことが必要不可欠である。評価系を実際に使用する企業研究者とも密にコミュニケーションを取り合い、より良いDILI評価系が構築されることを期待する。

著者の利益相反:開示すべき利益相反はない。

参考文献

1. 竹村 晃典, 伊藤 晃成. In vitro 肝毒性評価の進歩. 日本薬理学雑誌. 2020, 155, 6, 401-405.
2. K. Harada, H. Kohara, T. Yukawa, K. Matsumiya, and T. Shinozawa. Cell-based high-throughput screening for the evaluation of reactive metabolite formation potential. *Toxicol In Vitro*. 2021, 74, 105159.
3. Y. Sanuki, T. Araki, O. Nakazono, and K. Tsurui. A rapid mitochondrial toxicity assay utilizing rapidly changing cell energy metabolism. *J Toxicol Sci*. 2017, 42, 3, 349-358.
4. H. Kohara, P. Bajaj, K. Yamanaka, A. Miyawaki, K. Harada, K. Miyamoto, T. Matsui, Y. Okai, M. Wagoner, and T. Shinozawa. High-Throughput Screening to Evaluate Inhibition of Bile Acid Transporters Using Human Hepatocytes Isolated From Chimeric Mice. *Toxicol Sci*. 2020, 173, 2, 347-361.
5. T. Koga, K. Takeuchi, and K. Umehara. Establishment of an in vitro cholestasis risk assessment system using two-dimensional cultured HepaRG cells and 12 bile acids. *J Toxicol Sci*. 2023, 48, 1, 47-56.
6. M. Kawaguchi, T. Nukaga, S. Sekine, A. Takemura, T. Susukida, S. Oeda, A. Kodama, M. Hirota, H. Kouzuki, and K. Ito. Mechanism-based integrated assay systems for the prediction of drug-induced liver injury. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2020, 394, 114958.
7. Y. Ikeyama, T. Sato, A. Takemura, S. Sekine, and K. Ito. Hypoxia/reoxygenation exacerbates drug-induced cytotoxicity by opening mitochondrial permeability transition pore: Possible application for toxicity screening. *Toxicol In Vitro*. 2020, 67, 104889.
8. A. Takemura, S. Gong, T. Sato, M. Kawaguchi, S. Sekine, Y. Kazuki, T. Horie, and K. Ito. Evaluation of Parent- and Metabolite-Induced Mitochondrial Toxicities Using CYP-Introduced HepG2 cells. *J Pharm Sci*. 2021, 110, 9, 3306-3312.
9. A. Takemura, S. Ishii, Y. Ikeyama, K. Esashika, J. Takahashi, and K. Ito. New in vitro screening system to detect drug-induced liver injury using a culture plate with low drug sorption and high oxygen permeability. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2023, 52, 100511.
10. J.A. Dykens and Y. Will. The significance of mitochondrial toxicity testing in drug development. *Drug Discov Today*. 2007, 12, 17-18, 777-785.
11. C. Liu, S. Sekine, and K. Ito. Assessment of mitochondrial dysfunction-related, drug-induced hepatotoxicity in primary rat hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2016, 302, 23-30.
12. G. Labbe, D. Pessayre, and B. Fromenty. Drug-induced liver injury through mitochondrial dysfunction: mechanisms and detection during preclinical safety studies. *Fundam Clin Pharmacol*. 2008, 22, 4, 335-353.
13. Y. Ikeyama, T. Sato, A. Takemura, S. Sekine, and K. Ito. Successful energy shift from glycolysis to mitochondrial oxidative phosphorylation in freshly isolated hepatocytes from humanized mice liver. *Toxicol In Vitro*. 2020, 65, 104785.
14. Y. Sakai, M. Nishikawa, F. Evenou, M. Hamon, H. Huang, K.P. Montagne, N. Kojima, T. Fujii, and T. Niino. Engineering of implantable liver tissues. *Methods Mol Biol*. 2012, 826, 189-216.
15. C. Funk, C. Ponelle, G. Scheuermann, and M. Pantze. 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*. 2001, 59, 3, 627-635.
16. T. Susukida, S. Sekine, M. Nozaki, M. Tokizono, and K. Ito. Prediction of the Clinical Risk of Drug-Induced Cholestatic Liver Injury Using an In Vitro Sandwich Cultured Hepatocyte Assay. *Drug Metab Dispos*. 2015, 43, 11, 1760-1768.
17. T. Shinozawa, M. Kimura, Y. Cai, N. Saiki, Y. Yoneyama, R. Ouchi, H. Koike, M. Maezawa, R. R. Zhang, A. Dunn, A. Ferguson, S. Togo, K. Lewis, W. L. Thompson, A. Asai, and T. Takebe. High-Fidelity Drug-Induced Liver Injury Screen Using Human Pluripotent Stem Cell-Derived Organoids. *Gastroenterology*. 2021, 160, 3, 831-846.
18. S. U. Vorrink, Y. Zhou, M. Ingelman-Sundberg, and V. M. Lauschke. 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.
19. C. C. Bell, A. C. A. Dankers, V. M. Lauschke, R. Sison-Young, R. Jenkins, C. Rowe, C.E. Goldring, K. Park, S. L. Regan, T. Walker, C. Schofield, A. Baze, A. J. Foster, D. P. Williams, A. W. M. van de Ven, F. Jacobs, J. V. Houdt, T. Lähteenmäki, J. Snoeys, S. Juhila, L. Richert, and M. Ingelman-Sundberg. Comparison of Hepatic 2D Sandwich Cultures and 3D Spheroids for Long-term Toxicity Applications: A Multicenter Study. *Toxicol Sci*. 2018, 162, 2, 655-666.
20. 横井 毅. 薬物性肝障害評価研究の進歩. 日本薬理学雑誌. 2020, 155, 5, 323-328.
21. J. Uetrecht. Mechanistic Studies of Idiosyncratic DILI: Clinical Implications. *Front Pharmacol*. 2019, 10, 837.
22. R. Kato and J. Uetrecht. Supernatant from Hepatocyte Cultures with Drugs That Cause Idiosyncratic Liver Injury Activates Macrophage Inflammasomes. *Chem Res Toxicol*. 2017, 30, 6, 1327-1332.
23. R. Kato, Y. Ijiri, T. Hayashi, and J. Uetrecht. The 2-Hydroxyiminostilbene Metabolite of Carbamazepine or the Supernatant from Incubation of Hepatocytes with Carbamazepine Activates Inflammasomes: Implications for Carbamazepine-Induced Hypersensitivity Reactions. *Drug Metab Dispos*. 2019, 47, 10, 1093-1096.
24. W. R. Proctor, A. J. Foster, J. Vogt, C. Summers, B. Middleton, M. A. Pilling, D. Shienson, M. Kijanska, S. Ströbel, J. M. Kelm, P. Morgan, S. Messner, and D. Williams. Utility of spherical human liver microtissues for prediction of clinical drug-induced liver injury. *Arch Toxicol*. 2017, 91, 8, 2849-2863.
25. C. C. Bell, B. Chouhan, L. C. Andersson, H. Andersson, J. W. Dear, D. P. Williams, and M. Söderberg. Functionality of primary hepatic non-parenchymal cells in a 3D spheroid model and contribution to acetaminophen hepatotoxicity. *Arch Toxicol*. 2020, 94, 4, 1251-1263.
26. A. Segovia-Zafra, M. Villanueva-Paz, A. S. Serras, G. Matilla-Cabello, A. Bodoque-García, D. E. Di Zeo-Sánchez, H. Niu, I. Álvarez-Álvarez, L. Sanz-Villanueva, S. Godec, I. Milisav, P. Bagnaninchi, R. J. Andrade, M. I. Lucena, J. C. Fernández-Checa, F. J. Cubero, J. P. Miranda, and L. J. Nelson. Control compounds for preclinical drug-induced liver injury assessment: Consensus-driven systematic review by the ProEuroDILI network. *J Hepatol*. 2024, 81, 4, 630-640.
27. M. Arai, O. Yokosuka, K. Fujiwara, H. Kojima, T. Kanda, H. Hirasawa, and H. Saisho. Fulminant hepatic failure associated with benzbromarone treatment: a case report. *J Gastroenterol Hepatol*. 2002, 17, 5, 625-626.
28. A. Takemura, S. Gong, S. Sekine, and K. Ito. Inhibition of biliary network reconstruction by benzbromarone delays recovery from pre-existing liver injury. *Toxicology*. 2019, 423, 32-41.
29. W. Yang, Y. Tao, Y. Wu, X. Zhao, W. Ye, D. Zhao, L. Fu, C. Tian, J. Yang, F. He, and L. Tang. Neutrophils promote the development of reparative macrophages mediated by ROS to orchestrate liver repair. *Nat Commun*. 2019, 10, 1, 1076.
30. N. Tanimizu, N. Ichinohe, H. Suzuki, and T. Mitaka. Prolonged oxidative stress and delayed tissue repair exacerbate acetaminophen-induced liver injury in aged mice. *Aging (Albany NY)*. 2020, 12, 19, 18907-18927.

受理日: 2024年11月7日

サンドイッチ培養を用いずに 毛細胆管の形成・維持が可能な培地

The media for formation and maintenance of bile canaliculi without sandwich culture

渡邊 輝彦 Teruhiko Watanabe

関東化学株式会社 技術・開発本部 生命科学研究所 研究員
Researcher,
Life Science Laboratory, Technology and Development Division,
Kanto Chemical Co., Inc.

福田 翼 Tsubasa Fukuda

関東化学株式会社 技術・開発本部 生命科学研究所 研究員
Researcher,
Life Science Laboratory, Technology and Development Division,
Kanto Chemical Co., Inc.

キーワード

● ● ● 毛細胆管、胆汁酸排泄トランスポーター、サンドイッチ培養

01 はじめに

新薬開発における非臨床試験では、主に実験動物を用いた薬物の安全性予測が行われる。しかしながら、非臨床試験で安全と判断された薬物であっても、実験動物とヒトとの種差が要因で、その後予期せぬ副作用が判明する場合があります、開発や販売が中止に追い込まれることも少なくない。また近年、動物実験代替法を推奨する動きが国際的に加速していることもあり¹⁾、ヒト細胞を用いたin vitro評価系が強く求められている。

本稿では、in vitro評価系の中でも、胆汁排泄・胆汁うっ滞評価に焦点を当て、肝細胞を用いた毛細胆管の形成方法について概説する。加えて、従来の手法よりも効果的かつ簡便に毛細胆管を形成・維持することを可能にした当社開発培地(Bile Canaliculi-Extending Medium:BCEM)について紹介する。

02 In vitroにおける毛細胆管形成方法

毛細胆管は肝細胞間に形成される微小な管腔であり、ここに肝細胞で生成された胆汁と投与された一部の薬物が排泄される。この排泄機構は、Bile Salt Export Pump(BSEP)やMultidrug Resistance-associated Protein 2(MRP2)といった胆汁酸排泄トランスポーターが担う。これらのトランスポーターの機能が薬物によって阻害されると、胆汁中に多く含まれる胆汁酸が肝細胞内に蓄積し、胆汁うっ滞型の薬物性肝障害(Drug-Induced Liver Injury:DILI)を引き起こすと報告されている²⁾。例えば、トログリタゾン³⁾はDILIが原因で販売中止となった薬物であるが、その要因としてBSEPの阻害に伴う胆汁うっ滞の可能性が示唆されて

いる³⁾。DILIを回避するために、このようなトランスポーターの機能に対する薬物の影響を非臨床試験の段階で評価することが重要であると考えられている。しかし、ラットなどの動物実験を用いた胆汁排泄・胆汁うっ滞試験では、胆汁酸排泄トランスポーターの機能や胆汁酸の組成がヒトと異なるため⁴⁾、その予測精度は低い。そのため、より生体に類似した機能を示すヒト細胞を用いたin vitro評価系に期待が寄せられている。In vitro評価においては、手術の残余検体から単離される初代ヒト肝細胞(Primary Human Hepatocyte:PHH)がゴールドスタンダードとして用いられている。しかしながら、PHHは組織からの単離時に細胞の極性が失われており、通常の培養法では細胞極性が回復せず脱分化が進行するため、毛細胆管が形成されることはなく、胆汁排泄・胆汁うっ滞の評価には適していない⁵⁾。これを解決する手法として、PHHをコラーゲンなどの細胞外マトリックス(Extracellular matrix:ECM)により挟み込んで培養するサンドイッチ培養法が報告されている⁶⁾。コラーゲン以外にも、Engelbreth-Holm-Swanマウス肉腫から抽出されたECM成分が豊富に含まれるマトリゲルを用いた報告もある⁷⁾。サンドイッチ培養法は、肝細胞の脱分化を抑制する効果があり、通常の培養法よりも細胞極性の回復にも寄与することから、毛細胆管を形成させる手法として一般化している⁸⁾。しかしながら、胆汁排泄・胆汁うっ滞試験での実用化を想定した際に、サンドイッチ培養法には下記①～④の解決すべき課題が残っている。①重層するECMへの被験薬の吸着⁹⁾、②動物由来ECMのロット間差¹⁰⁾、③形成された毛細胆管腔の容積不足(短い、細い)¹¹⁾、④PHHの機能低下^{12, 13)}。これらの課題により、胆汁排泄・胆汁うっ滞試験で取得したデータの信頼性に影響を及ぼすことが懸念されている。

03 BCEM (Bile Canaliculi-Extending Medium)の性能

我々は上記①～④の課題を解決するために、細胞接着および毛細胆管形成に優れた培地 (BCEM 1st) と、毛細胆管や肝機能の長期維持に優れた培地 (BCEM 2nd) を開発した。以降は、BCEMの性能について紹介する。

3.1 BCEM 1stの性能

接着型PHH (ヒト付着可能肝細胞、BioIVT社) を市販の細胞融解用培地により融解し、BCEM 1stまたは市販の播種用培地で懸濁した。I型コラーゲンをコートした24wellプレートに懸濁した細胞を 3.3×10^5 cells/wellで播種し、37℃、5%CO₂条件下で2時間インキュベートした後、顕微鏡観察を行った。その結果、BCEM 1stを用いた条件では市販培地を用いた条件と比較して、多くの細胞が接着・伸展している様子が認められた (図1)。一般的には、PHHが培養容器に接着・伸展するまで4時間程度は必要であるが、BCEM 1stに懸濁して播種することで早期に接着することが示唆された。さらに、BCEM 1stを用いて4日目まで培養し、免疫組織染色を実施した結果、市販培地に比べて多数のMRP2の発現が認められた (図2)。このことから、BCEM 1stは毛細胆管の形成を促進することが示唆された。これは、BCEM 1stによってPHHが培養容器に早期接着することにより、解凍直後から起こる脱分化が最小限に抑えられ、失われた細胞極性が早期に回復したことで起きた現象だと考えている。

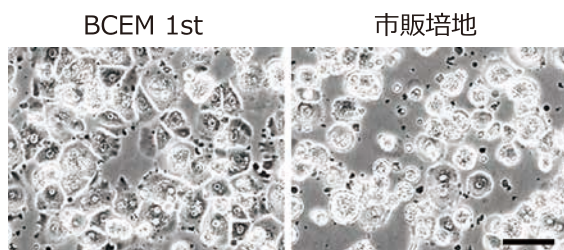


図1 播種2時間後の明視野顕微鏡像
倒立型顕微鏡IX-83 (オリンパス) を用いて撮影した。
スケールバーは50 μmを表す。

3.2 BCEM 2ndの性能

接着型PHHをBCEM 1stに懸濁し、I型コラーゲンをコートした96wellプレートに 1×10^5 cells/wellで播種し、播種4時間後、1日後、2日後にBCEM 1stで培地交換を行った。培養3日目以降はBCEM 2ndを使用して培地交換を行い、21日目までECMを重層せずに培養した (BCEM条件) (図3)。また、対照として、市販培地を用いたマトリゲルサンドイッチ培養法 (培養1日目、8日目、15日目にマトリゲル重層) により21日目まで培養した条件も用意した (従来条件)。培養7日目、14日目、21日目にMRP2の蛍光基質 (CDFDA) およびBSEPの蛍光基質 (Tauro-nor-THCA-24-DBD) を曝露し、胆汁酸排泄トランスポーターを介して蛍光基質が毛細胆管へ排泄されるかどうかを条件間で比較した。なお、マトリゲルサンドイッチ培養法および胆汁酸排泄トランスポーターの排泄機能評価法については、既報のプロトコルを参照した (図4)¹¹⁾。その結果、BCEM条件では培養7日目、14日目、21日目の何れにおいても各蛍光基質が細胞-細胞間に集積している様子が蛍光顕微鏡で観察された (図5)。一方、従来条件では何れの日においても蛍光基質の十分な集積が認められなかった。このことから、BCEM条件では、従来条件よりも伸長した毛細胆管が形成されており、MRP2およびBSEPを介した排泄機能が少なくとも14日間は高水準で維持されていることが示唆された。

次に、上記BCEM条件で培養した接着型PHHを経時的 (培養3日目、7日目、14日目、21日目) にサンプリングし、肝機能に関わる複数のマーカー遺伝子の発現をリアルタイムPCRにより解析した。その結果、肝取り込みトランスポーターとして知られる

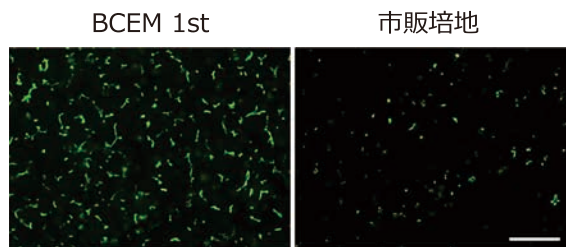


図2 培養4日目のMRP2染色像
倒立型顕微鏡IX-83 (オリンパス) を用いて撮影した蛍光画像。
スケールバーは100 μmを表す。

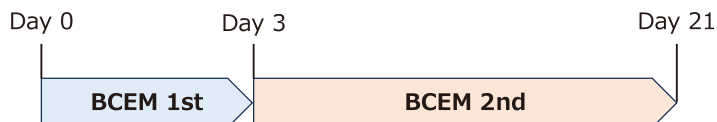


図3 BCEM条件における培養日程
播種4時間後および1～3、6～10、13～17、20日目は培地交換を実施。

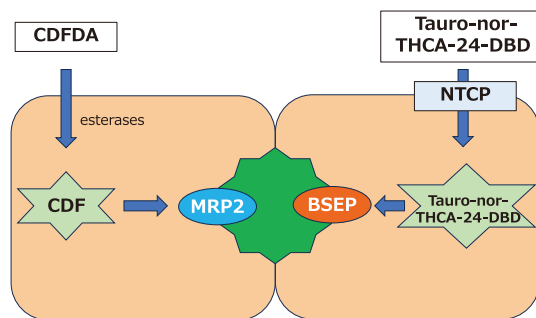


図4 蛍光基質を用いた胆汁酸排泄トランスポーターアッセイの概要
CDFDAは細胞内のesteraseによりCDFへと変換され、MRP2を介して毛細胆管へと排泄される。
Tauro-nor-THCA-24-DBDはNTCPにより細胞内に取り込まれ、BSEPを介して毛細胆管へと排泄される。

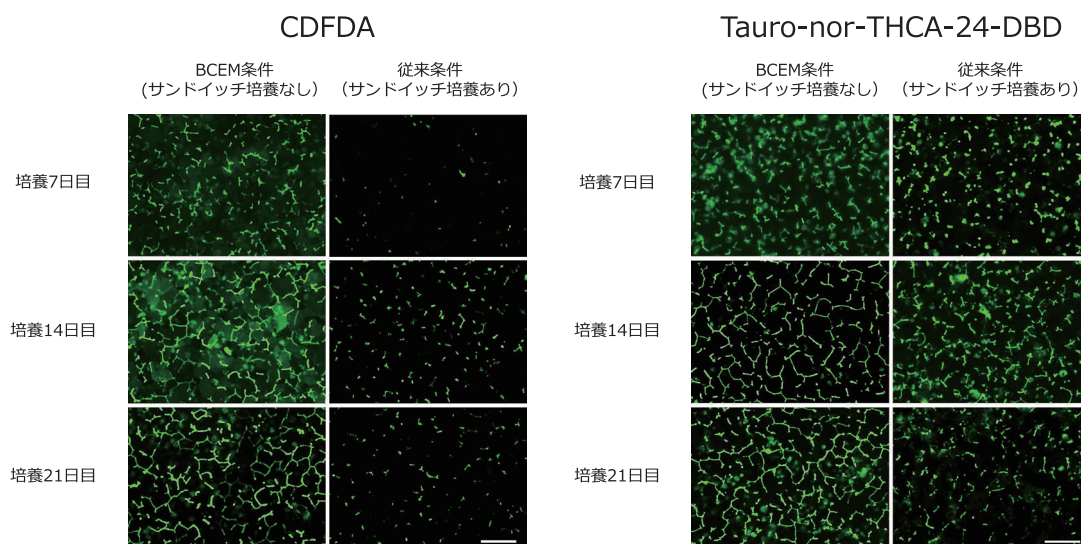


図5 胆汁酸排泄トランスポーターの排泄機能評価における蛍光基質の集積
倒立型顕微鏡IX-83(オリンパス)を用いて撮影した蛍光画像。
スケールバーは100 μm を表す。

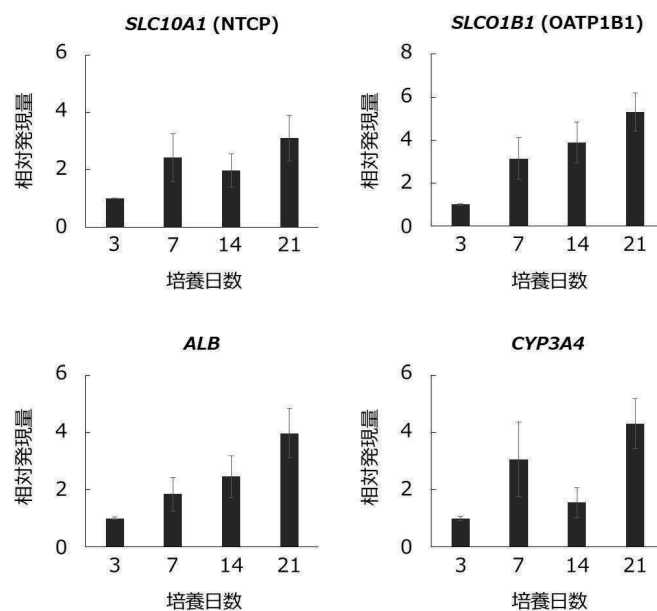


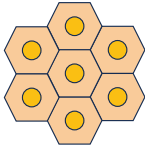
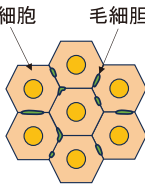
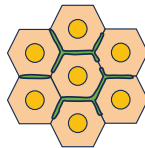
図6 BCEM条件で培養したPHHの経時的な各遺伝子発現量
データは、培養3日目の発現量を1とした際の相対発現量(平均値 $\pm$ 標準偏差)。

Organic Anion Transporting Polypeptide 1B1 (OATP1B1, 遺伝子*SLC01B1*)とNa⁺-Taurocholate Cotransporting Polypeptide (NTCP, 遺伝子*SLC10A1*)については、BCEM 2ndで培養するにつれて発現が高くなる傾向が認められた(図6)。また、代表的な肝機能の指標として知られるアルブミン(ALB)と薬物代謝酵素シトクロムP450 3A4(CYP3A4)に関しても発現が高くなる傾向が認められた。これらの結果から、BCEM 2ndで培養したPHHの肝機能は長期間維持されていることが示唆された。

04 BCEMの特長と利点

これまでに紹介した結果が示すように、BCEMを用いることでサンドイッチ培養せずにPHHの毛細胆管を形成・維持することが可能となる。その毛細胆管は従来条件よりも伸長しており、胆汁酸排泄トランスポーターの排泄機能も長期間にわたり維持されている。さらに、PHHのその他の機能についても長期間維持されていると考えられる。以上の特長により、BCEMは従来条件の課題であった①ECMへの被験薬の吸着、②ECMのロット間差、③毛細胆管の管腔容積不足、④PHHの機能低下、を何れも解決する培地だと考えられる(表1)。したがって、BCEMは胆汁排泄・胆汁うつ

表1 毛細胆管を形成する各手法の特徴

	従来手法		新規手法 (BCEM)
	A: 通常培養	B: サンドイッチ培養	
細胞の模式図			
ECM重層	なし	あり	なし
培地	市販培地	市販培地	BCEM
毛細胆管の形成可否	不可	可	可
管腔容積	小	中	大
肝機能	急速に低下	一定期間維持	約3週間維持

滯試験の予測精度およびデータ信頼性の向上に寄与することが期待される。

胆汁排泄・胆汁うっ滞試験以外の応用例として、3.1で紹介したBCEM 1stの優れた細胞接着性を活かすことで、浮遊型PHHのような接着しないと諦められていた細胞を接着させることも期待できるところである¹⁴⁾。また、BCEM 2ndは、長期培養が必要な低クリアランス化合物を対象とした非臨床研究においても大いに役立つ可能性がある。

05 | 終わりに

本稿では、胆汁排泄・胆汁うっ滞試験のin vitro評価系で必須となる毛細胆管を形成する手法について概説し、従来よりも簡便な手法で高機能な毛細胆管を形成・維持可能な当社開発培地BCEMについて紹介した。本培地により、胆汁排泄・胆汁うっ滞試験のin vitro評価系の構築が促進され、近い将来実験動物を用いない試験系が実用化されることを願っている。また、BCEMが、従来よりも生体に近い肝臓モデルや、腸肝循環を模した共培養系、生体模倣システム (Microphysiological system: MPS) などを構築する際に活用され、創薬研究がこれまで以上に広がることを期待している。

参考文献

1. J. J. Han. FDA Modernization Act 2.0 allows for alternatives to animal testing. *Artif Organs*. 2023, 47, 3, 449-450.
 2. S. S. Strautnieks, L. N. Bull, A. S. Knisely, S. A. Kocoshis, N. Dahl, H. Arnell, E. Sokal, K. Dahan, S. Childs, V. Ling, M. S. Tanner, A. F. Kagalwalla, A. Németh, J. Pawlowska, A. Baker, G. Mieli-Vergani, N. B. Freimer, R. M. Gardiner, and R. J. Thompson. A gene encoding a liver-specific ABC transporter is mutated in progressive familial intrahepatic cholestasis. *Nat Genet*. 1998, 20, 233-238.
 3. K. Yang, J. L. Woodhead, P. B. Watkins, B. A. Howell, and K. L. R. Brouwer. Systems Pharmacology Modeling Predicts Delayed Presentation and Species Differences in Bile Acid-Mediated

Troglitazone Hepatotoxicity. *Clin Pharmacol Ther*. 2014, 96, 5, 589-598.
 4. T. L. Marion, C. H. Perry, R. L. St. Claire III, and K. L. R. Brouwer. Endogenous bile acid disposition in rat and human sandwich-cultured hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2012, 261, 1, 1-9.
 5. I. Kaur, A. Vasudevan, P. Rawal, D. M. Tripathi, S. Ramakrishna, S. Kaur, and S. K. Sarin. Primary Hepatocyte Isolation and Cultures: Technical Aspects, Challenges and Advancements. *Bioengineering*. 2023, 10, 2, 131.
 6. J. C. Dunn, R. G. Tompkins, and M. L. Yarmush. Hepatocytes in collagen sandwich: evidence for transcriptional and translational regulation. *J Cell Biol*. 1992, 116, 4, 1043-1053.
 7. D. Deharde, C. Schneider, T. Hiller, N. Fischer, V. Kegel, M. Lübberstedt, N. Freyer, J. G. Hengstler, T. B. Andersson, D. Seehofer, J. Pratschke, K. Zeilinger, and G. Damm. Bile canaliculi formation and biliary transport in 3D sandwich-cultured hepatocytes in dependence of the extracellular matrix composition. *Arch Toxicol*. 2016, 90, 2497-2511.
 8. B. Swift, N. D. Pfeifer, and K. L. R. Brouwer. Sandwich-Cultured Hepatocytes: An *in vitro* Model to Evaluate Hepatobiliary Transporter-Based Drug Interactions and Hepatotoxicity. *Drug Metab Rev*. 2010, 42, 3, 446-471.
 9. M. Wolf. Influence of matrigel on biodistribution studies in cancer research. *Pharmazie*. 2008, 63, 1, 43-48.
 10. S. R. Caliairi and J. A. Burdick. A Practical Guide to Hydrogels for Cell Culture. *Nat Methods*. 2016, 13, 5, 405-414.
 11. S. Horiuchi, Y. Kuroda, R. Oyafuso, Y. Komizu, K. Maeda, and S. Ishida. Formation of functional, extended bile canaliculi, and increased bile acid production in sandwich-cultured human cryopreserved hepatocytes using commercially available culture medium. *Arch Toxicol*. 2024, 98, 2605-2617.
 12. C. Rowe, C. E. P. Goldring, N. R. Kitteringham, R. E. Jenkins, B. S. Lane, C. Sanderson, V. Elliott, V. Platt, P. Metcalfe, and B. K. Park. Network analysis of primary hepatocyte dedifferentiation using a shotgun proteomics approach. *J Proteome Res*. 2010, 9, 5, 2658-2668.
 13. C. C. Bell, A. C. A. Dankers, V. M. Lauschke, R. Sison-Young, R. Jenkins, C. Rowe, C.E. Goldring, K. Park, S. L. Regan, T. Walker, C. Schofield, A. Baze, A. J. Foster, D. P. Williams, A. W. M. van de Ven, F. Jacobs, J. V. Houdt, T. Lähteenmäki, J. Snoeys, S. Juhila, L. Richert, and M. Ingelman-Sundberg. Comparison of Hepatic 2D Sandwich Cultures and 3D Spheroids for Long-term Toxicity Applications: A Multicenter Study. *Toxicol Sci*. 2018, 162, 2, 655-666.
 14. G. A. Helena, T. Watanabe, Y. Kato, N. Shiraki, and S. Kume. Activation of cAMP (EPAC2) signaling pathway promotes hepatocyte attachment. *Sci Rep*. 2023, 13, 1, 12352.

受理日：2024年11月6日

キーワード解説

■ DILI (Drug-Induced Liver Injury): 薬物性肝障害

薬剤やその代謝産物が肝臓に有害な影響を及ぼすことで発生する副作用のひとつ。医薬品だけでなく、健康食品、サプリメントも原因となる。症状は軽度なことから重篤な肝不全まで幅広いが、現状の技術では直接的な診断および発症の予測は困難である。

■ in vitro, in vivo

In vitroはラテン語で“in glass (試験管内で)”を意味し、試験管や培養容器に生体から分離された分子・細胞などを移して、人工的に生体を模倣した実験環境のことを指す。in vivoはラテン語で“within the living” (生体内で)”を意味し、ヒトや実験動物など生きている生物個体での研究を指す。

■ バイオマーカー

疾患の有無、症状の変化や治療の効果を判定するための生体由来の指標で、心電図や血液中のタンパク質などがそれに該当する。健康診断から医薬品開発まで幅広い用途において活用される。近年、ゲノム解析やAI技術の進展により、バイオマーカー探索研究が加速しており、疾患の早期発見や個別化医療への応用が期待されている。

NEW

毛細胆管形成用培地&長期培養用培地 (開発中)

ciKIC[®] BCCEM 1st & 2nd

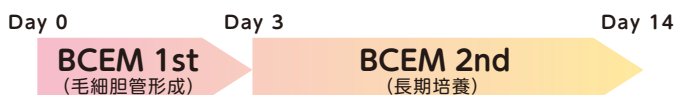
特長

- ☑ サンドイッチ培養不要
- ☑ 初代ヒト肝細胞を長期培養可能

用途

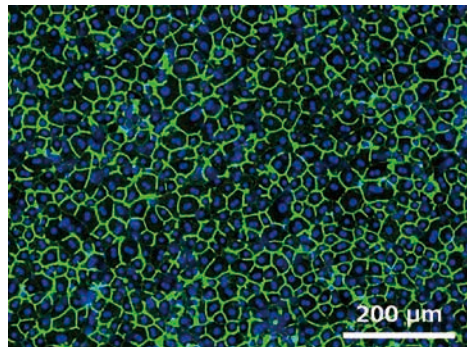
- ☑ 胆汁排泄・胆汁うっ滞試験
- ☑ 低クリアランス化合物評価

使用例



初代ヒト肝細胞をCollagen Iプレートに播種し、BCCEM1st&2ndで培養
右図は毛細胆管に局在するF-actinの染色像
(培養14日目、F-actin/Nucleus)

本培地は、東京科学大学 生命理工学院 桑教授との共同研究内容をベースとして開発しております。



当社HPでは、ケミカルタイムス最新号、バックナンバーを公開しております。

ケミカルタイムス URL
<https://www.kanto.co.jp/times.html>

関東化学 URL
<https://www.kanto.co.jp/>

2次元バーコードはこちらです ▶▶▶



※無断転載および複製を禁じます。

 関東化学株式会社

〒103-0022 東京都中央区日本橋室町2丁目2番1号
室町東三井ビルディング

電話(03)6214-1090 FAX(03)3241-1047

E-mail: chemiti-info@kanto.co.jp 編集責任者: 菅 孝剛

2025年1月発行