

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。

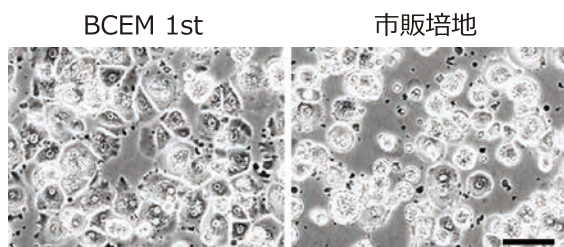


図1 播種2時間後の明視野顕微鏡像
倒立型顕微鏡IX-83 (オリンパス) を用いて撮影した。
スケールバーは50 μmを表す。

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

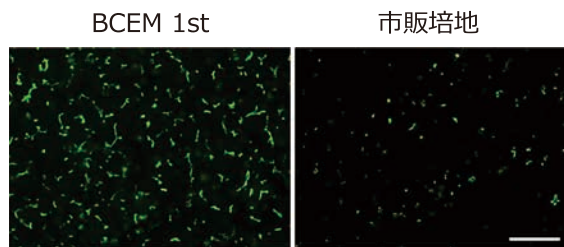


図2 培養4日目のMRP2染色像
倒立型顕微鏡IX-83 (オリンパス) を用いて撮影した蛍光画像。
スケールバーは100 μmを表す。

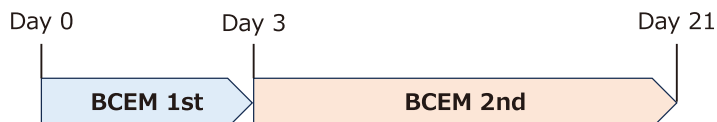


図3 BCEM条件における培養日程
播種4時間後および1～3、6～10、13～17、20日目は培地交換を実施。

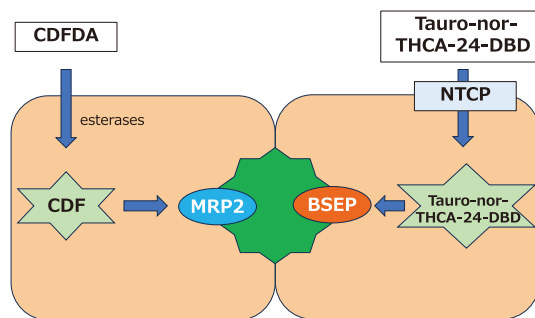


図4 蛍光基質を用いた胆汁酸排泄トランスポーターアッセイの概要
CDFDAは細胞内のesteraseによりCDFへと変換され、MRP2を介して毛細胆管へと排泄される。
Tauro-nor-THCA-24-DBDはNTCPにより細胞内に取り込まれ、BSEPを介して毛細胆管へと排泄される。

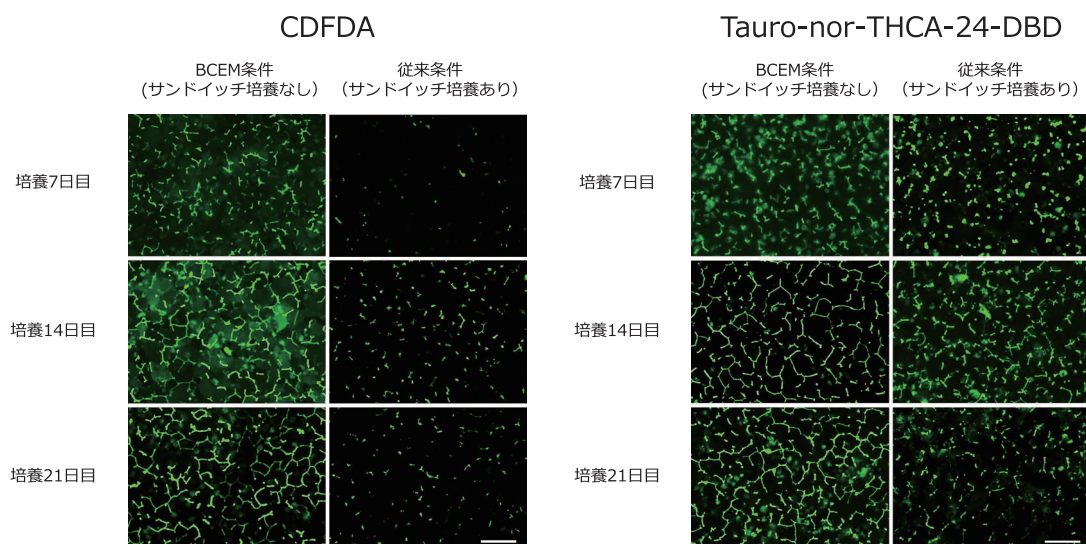


図5 胆汁酸排泄トランスポーターの排泄機能評価における蛍光基質の集積
倒立型顕微鏡IX-83(オリンパス)を用いて撮影した蛍光画像。
スケールバーは100 μm を表す。

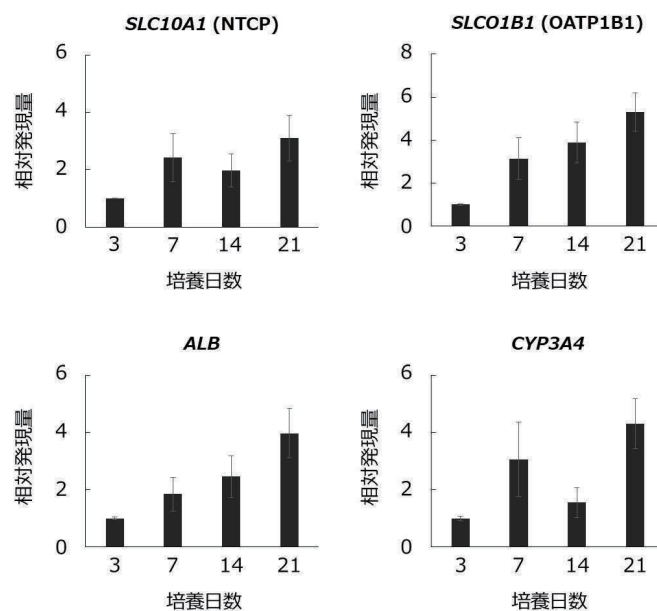


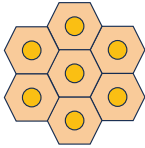
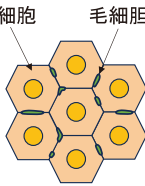
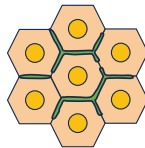
図6 BCEM条件で培養したPHHの経時的な各遺伝子発現量
データは、培養3日目の発現量を1とした際の相対発現量(平均値 $\pm$ 標準偏差)。

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