

小型肝細胞を用いた創薬スクリーニングツールの開発

清水 恭子 [株式会社プライマリーセル／製造部部長]
三高 俊広 [札幌医科大学フロンティア医学研究所
組織再生学部門／教授]

谷水 直樹 [札幌医科大学フロンティア医学研究所
組織再生学部門／講師]

大栄 秀和 [札幌医科大学フロンティア医学研究所
組織再生学部門／助教]

金濱 吉範 [株式会社プライマリーセル／製造部]

背景・目的

肝臓は、医薬品の体内動態に影響する最も重要な臓器であり、創薬開発では肝臓での薬物動態測定が必須であるが、従来用いられている初代肝細胞やミクロゾーム等は、非常に高価であることや生存期間が短いなどの問題がある。

共同研究者の三高らが発見した小型肝細胞は高い増殖能を持ち、かつ肝細胞の重要な機能であるシトクロムP450(CYP)など薬物代謝酵素活性の発現・誘導が可能であることから、安価で高い細胞機能を持つ細胞供給が可能である。

一方で、小型肝細胞の分離・培養については技術や経験を必要とするものであり、製品化の為には取り扱いを簡便にするためのキット化が必要である。また、創薬スクリーニングへの利用を目的とするためには、マルチウェルプレート培養などマススクリーニングに対応する必要がある。

本研究は取り扱いが容易で、かつマススクリーニングに対応した創薬スクリーニング用小型肝細胞培養キットの開発および性能を維持しつつユーザーに届けるための輸送技術の開発を目的とする。

内容・方法

(1) 培養容器(プレート)の検討

7~9週齢のSDラットより小型肝細胞を採取、10~14日間培養を行い形成された小型肝細胞コロニーを回収し凍結ストックとした。

ストックした凍結小型肝細胞を10コロニー/wellの密度で24-wellプレートに播種し、14日間培養を行い接着・増殖についての形態観察を行った。

のちに96-well平底および96-well丸底のプレートにも同様に播種し観察を行った。

(2) 細胞機能評価

96-wellプレート(平底／丸底)で14日間培養した凍結小型肝細胞を回収し、リアルタイムPCRにより肝細胞マーカーや薬物代謝酵素P450についての遺伝子発現解析を行った。

さらに、96wellプレートで14日間培養した凍結小型肝細胞にMatrigelを添加しさらに7日間培養・成熟化させた成熟小型肝細胞を用いて、これにリファンピシン・オメプラゾール・フェノバルビタールを添加し、その応答性についてリアルタイムPCRによる遺伝子発現解析を行った。

(3) 輸送条件検討

細胞製品の輸送を想定して、成熟化させた小型肝細胞を従来方法(発泡容器+クール便)と32°C定温輸送箱を用いて宅急便による細胞輸送を行い、輸送温度等が細胞機能に与える影響についてリアルタイムPCRによる遺伝子発現解析を行い検証した。

結果・成果

(1) 培養容器(プレート)の検討

細胞採取は合計10回行った。小型肝細胞は、培養10日目~14日目には数十個の細胞からなるコロニーを形成させた後回収し、-80°Cで凍結保存した。

24-wellプレートに播種した凍結小型肝細胞では、40~50%の細胞コロニーが培養器に接着した後増殖し、14日目には数百個からなるコロニーを形成した。一方で、24-wellプレートに10コロニー/wellの密度ではコロニー相互間隔が広く開いてしまったため、接着効率・増殖能がwell間で一定にならないと云う問題が生じた。そのため、接地面のより小さな96-wellプレートを用いて、細胞の回収効率が一定になるように工夫した。また、細胞をより密集させるために様々なメーカーの平底のプレートと丸底プレートを用いて、回収効率等を検討した。

10 colonies/wellの濃度で播種した凍結小型肝細胞は、96-wellプレートを用いた方が、24-wellプレートを用いた場合より、14日目における回収効率も高かった。また、平底プレートと丸底プレートでは、丸底プレートを用いて培養した小型肝細胞の方が接着効率・増殖能とも高かった。メーカーの違いもあり、適切なメーカーの96-well丸底プレートを用いることとした。(図1、2)

(2) 細胞機能評価

リアルタイムPCRによる遺伝子発現解析の結果、肝マーカーであるAlbumin(ALB)、Glucose-6-phosphatase(G6PC)、Tryptophan 2,3-dioxygenase(TDO2)および薬

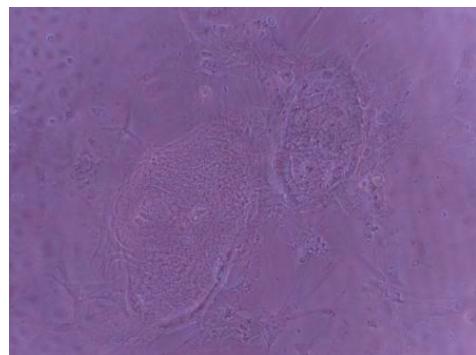


図1. 凍結小型肝細胞(96well 平底 Day14)

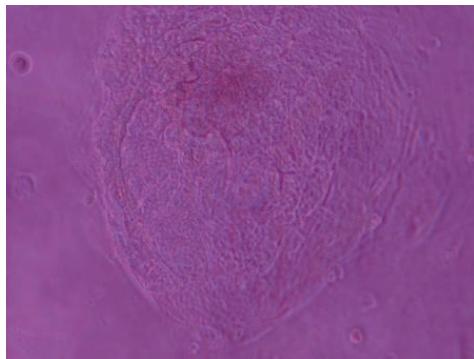


図2. 凍結小型肝細胞(96well 丸底 Day 14)

物代謝酵素 CYP1a2、2b1、2c11、3a1/23の発現が認められた。うち、ALB、G6PC、CYP1a2、2b1、3a1/23については、ラット初代肝細胞培養1日目の細胞と同等もしくは高い発現量を示した。(図3)

また、平底プレートと丸底プレートの比較では、全ての項目において丸底プレートで培養した小型肝細胞の遺伝子発現が高かった。(図4)

これらの結果から、96-well マルチウェルプレートにおいて高い肝細胞機能を維持した小型肝細胞を培養可能であることが分かった。

さらに、丸底プレートで培養することにより、細胞機能の向上が認められた。

(3) 輸送試験

輸送前と輸送後(クール便・32°C 定温)24時間後の遺伝子発現を比較すると、従来法(クール便輸送)ではALBとCYP1a2で発現が低くなり、G6PCは発現を確認できなかったのに対し、32°C 定温輸送ではG6PCの発現は輸送前と変わらず、ALBとCYP1a2では発現がやや低下したもののクール便輸送と比較すると明らかに改善された。輸送温度を32°Cで一定に保つことにより、小型肝細胞の輸送中の機能低下を防ぐことが分かった。

(4) 薬剤応答試験

遺伝子発現解析によって薬剤添加による反応を比較したところ、CYP1a2の発現量はオメプラゾールの添加4日目で大きく上昇した。10日目でもオメプラゾールの添加による発現量の上昇がみられた。

CYP2b1では、フェノバルビタールの添加により4日目で発現が大きく上昇、10日目でも上昇がみられた。また、オメプラゾール添加によって4日目および10日目で発現量の大きな上昇が見られた。

CYP3a1/23の発現はオメプラゾール、フェノバルビタールの添加により、4日目、10日目ともに大きく発現量が上昇した。以上のことより、成熟小型肝細胞の薬剤に対する反応性を確認できた。

(5) まとめ

これまでの結果より、96-well プレートで培養した小型肝細胞において、増殖、成熟化、薬剤への反応性など小型肝細胞の持つ高い細胞機能性を確認することがで

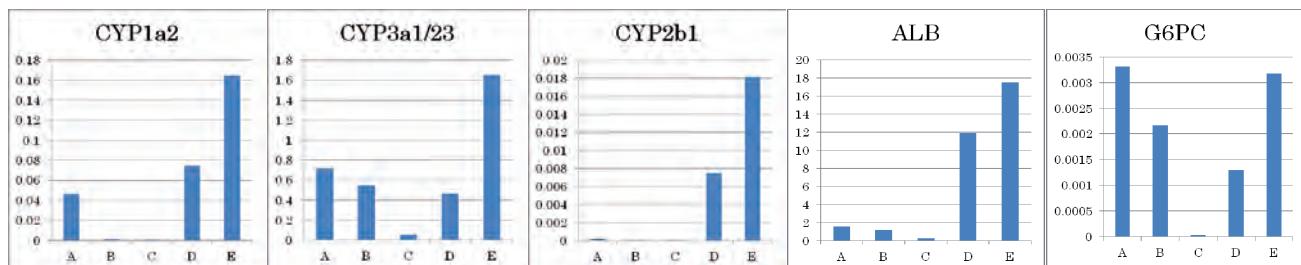


図3. 凍結小型肝細胞と初代ラット肝細胞のリアルタイムPCR
ラット初代肝細胞(A=培養1日目、B=培養3日目、C=培養7日目)、
凍結小型肝細胞(培養14日目:D=96well 平底、E=96well 丸底)

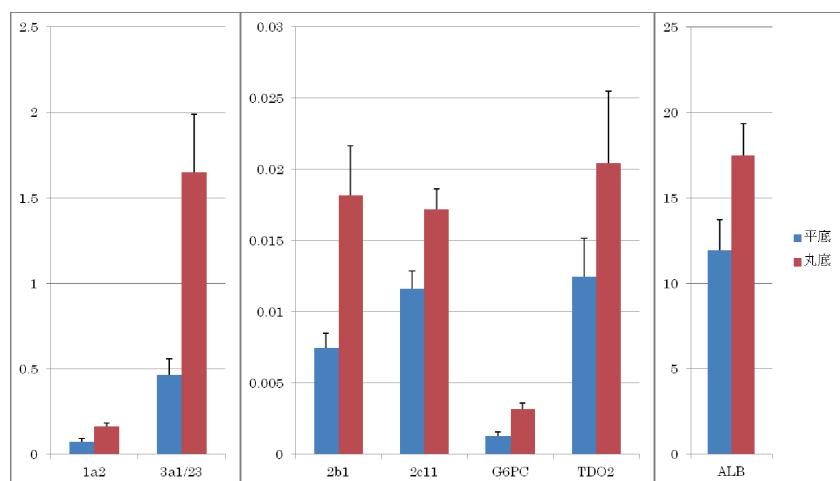


図4. 凍結小型肝細胞(培養14日目)96well 平底・丸底のリアルタイムPCR 結果

きたことから、創薬スクリーニングを目的とするために必須であったマスクリーニングへの対応が可能となつた。また、輸送技術については、32℃定温輸送箱を利用した細胞輸送法により、細胞輸送中の温度変化などによる細胞品質劣化の軽減が可能となつた。

以上より、創薬スクリーニング用小型肝細胞培養キットの製品形態は、凍結小型肝細胞を96well plateに播種し14日間培養後、Matrigelを添加し7日間培養(成熟化)をした培養細胞と専用培地を合わせたキット構成とし、32℃定温輸送により発送することとした。

今後の展望

今回の成果を踏まえ、今後は製品化に向けて再現性試験と追加試験として長期培養による細胞機能評価を行い、結果については販促資料としても活用する予定である。また、研究開発後は価格の設定やプロトコルの整備等を進めた後、試作品の試験販売を行いその結果を踏まえ一般販売へつなげていきたい。既存顧客数か所にヒアリングをしたところ、現時点で興味を示す顧客がみられている。

販売に関しては、既存顧客への案内やメールニュース、および自社製品の販売ルート(コスマ・バイオ、岩井化学薬品、北海道システム・サイエンス)を通じたパンフレット配布等により拡販を進める。