

合成細胞外マトリクスによるラット肝細胞P450活性の増加

By Mark E. Rothenberg¹, James J. Cali², Mary Sobol², Michael W. Briggs¹ and Todd Upton¹, ¹Technical Applications, Corning Life Sciences, ²Promega Corporation

アブストラクト

本研究では、新しい三次元合成マトリクスが肝細胞の生理機能に与える影響について検討しました。Corning社のUltra-Web™ 表面ラボウェア、Ultra-Web™ ポリアミン表面ラボウェア、ならびにBecton Dickinson (BD) 社のBioCoat™ I 型コラーゲンマイクロプレートで肝細胞を培養しました。その後、既知のシトクロムP450誘導剤2種類で48時間処理し、P450活性を P450-Glo™ Assayにより測定しました。その結果、合成マトリクスUltra-Web™コートマイクロプレートで培養したラット初代培養肝細胞は、生理機能の亢進を示しました。

イントロダクション

セルベースアッセイを実施する際に直面する重要な問題点は、二次元培養系で観察される生理機能が生体内でみられる生理機能を真に反映しているか否かという点です。生体内では、細胞は細胞外マトリクス (ECM) との相互作用により、ダイナミックな三次元構造を形成しています。多くの細胞機能 (発生、増殖、情報伝達など) は、このような相互作用により生じます(1,2)。ECMにはさまざまな機能があり、細胞の支持や足場としての役割を果たし、組織間の境界を形づくるほか、増殖因子や他のリガンドを隔離することにより、細胞間の情報伝達を手助けしています。したがって、生体内組織における細胞基底膜/ECM間の相互作用を再現できる *in vitro* 表面が必要とされています。今後、細胞の生理機能 (発生、代謝機能など) を保持させる技術 (細胞表面、血管、培地、あるいはその組み合わせ) は、基礎研究および新薬開発研究における重要性を増していくと予想されています(3)。

ECM様の製品としては、Matrigel™ (BD)、コラーゲンなどさまざまなものが市販されています。これらの製品は、動物由来であること、室温で不安定であること、バッチ間変動を示すことや、マトリクス内に増殖因子を含有することから、問題が多いと考えられます。このような問題すべての回避策として、Corning社、Donaldson社およびSurModics 社は、合成マトリクスUltra-Web™ を採用した新製品ラインを開発しました。Corning社のUltra-Web™ 表面ラボウェアは、増殖の足場となる ECM 構造類似のナノファイバーを提供し、細胞接着、増殖および組織化のナノレベルでのトポグラフィーを得ることができます。Ultra-Web™ のナノファイバー (図1、パネルA) は、コラーゲンのナノファイバー (図1、パネルB) に近いサイズですが、完全合成品で

あるため、表面が安定しており、多くの新薬開発アプリケーションにとって理想的な技術です。独自の Ultra-Web™ 構造は、さまざまな種類の細胞を用いた研究から、生体内に近い細胞応答を促進することが明らかになっています (詳細はwww.corning.com/lifesciences/をご覧ください)。Ultra-Web™ マトリクスにポリアミンを共有結合することにより、表面を荷電させ、細胞接着性を増大させた製品も市販されています。このナノファイバーは、さらに各種生体分子 (増殖因子、ペプチド配列、炭水化物成分など) を付着させることにより修飾できるため、用途に合わせて細胞や組織に特有の微小環境を構築することができます(4)。

肝細胞は二次元組織培養表面で培養すると、その形態および代謝に関する表現型を急激に失います。そのため、既存の *in vitro* 培養表面に代わる新たな表面を必要とする細胞の代表例です。しかし、肝細胞を生体内の ECM に近いコート表面で培養すると、その表現型はより長期間持続されます(1,5)。

肝細胞の主な機能は、シトクロムP450 (CYP) 酵素による薬剤化合物の酸化的代謝です。酸化的代謝を受けた化合物は、水溶性が増大し排出されやすい状態になります。製薬業界では、被験化合物によるCYP阻害および誘導のスクリーニングに、蛍光、発光およびLC/MSベースのCYP酵素アッセイが幅広く使用されています。CYP1A およびCYP3A 活性は多くの薬剤により誘導され、誘導作用を有する薬剤自体または同時に投与した薬剤の代謝に影響を及ぼす可能性があるため、薬剤による誘導作用のスクリーニングは一般的に実施されています。

本研究では、3 種類の表面で培養したラット初代培養肝細胞の機能的活性を、P450-Glo™ CYP3A4 Assay (カタログ番号V8901) を用いて比較しました。検討対象とした3種類の表面は、Ultra-Web™、Ultra-Web™ ポリアミン (それぞれCorning社カタログ番号3872xx1および3873xx1) および I 型コラーゲン (BD) です。誘導剤としては、げっ歯類のCYP3A 活性に対する誘導作用が知られている2種類の薬剤、デキサメタゾン (Dex) および pregnenolone-16 α -carbonitrile (PCN) を用いました。CYP3A酵素活性の誘導は、培養条件の影響を特に受けやすいことから、肝細胞の表現型のマーカーとして適しています。



図 1. Ultra-Web™ および I 型コラーゲン表面

パネルA. Ultra-Web™ 表面の電子顕微鏡画像。わずかに親水性で荷電していない。Ultra-Web™ ポリアミン表面 (写真は示さず) もわずかに親水性だが、陽性に荷電している。顕微鏡観察では、両Ultra-Web™ 表面は同様の外観を呈する。パネルB. パネルAと同じスケールで示した I 型コラーゲンのナノファイバー。パネルC. Corning社のUltra-Web™ 表面マイクロプレートおよびディッシュ。

アッセイ方法

P450-Glo™ Assayは、CYP450酵素の発光性基質であるビートルルシフェリン誘導体を使用しています(6)。これらの基質は、CYP酵素によりルシフェリンに代謝されてはじめて活性を示します。ルシフェリンはルシフェラーゼと反応し、CYP酵素活性に比例する光量を発します。ラット肝細胞におけるCYP3Aの誘導を測定するため、細胞を単層培養し、無処理細胞(対照)とCYP3A誘導剤(DexおよびPCN)処理細胞を比較しました。処理後、CYP3A 酵素の発光性基質であるルシフェリン-PFBEを培地に添加し、細胞とインキュベーションしました。この基質は、ラット肝細胞ではCYP3A1およびCYP3A2に選択性を示します。細胞内のCYP3Aがルシフェリン-PFBEをルシフェリンに変換すると、ルシフェリンは細胞内から培地中へと移行します。培地サンプルを採取し、ルシフェラーゼを含むルシフェリン検出試薬と混合した後、発光信号をルミノメーターで測定しました。細胞はそのまま培養し、CellTiter-Glo® Assay (カタログ番号G7570) を用いて生細胞数に比例する ATP 量を測定することにより、細胞の生死を判別しました。P450-Glo™ CYP3A4アッセイの発光信号測定値を、生死判別アッセイの発光信号測定値で除することにより、生細胞数で補正したCYP 活性を求めました。CYP依存性の発光量を無処理対照と比較して有意に増大させた化合物を、CYP3A誘導剤と判定しました。

結果

96 ウェルの I 型コラーゲンコートプレート、ならびに Ultra-Web™ または Ultra-Web™ ポリアミンマイクロプレートに播種したラット初代培養肝細胞を顕微鏡で観察したところ、培養肝細胞に特徴的な形態学的外観(5) を示しました(データ未掲載)。肝細胞をDexまたはPCNで48 時間処理し、P450-Glo™ Assayを用いてCYP3A活性をアッセイしました。バックグラウンド(細胞を播種していないウェル)の発光量に関しては、3種類の表面間に差は認められませんでした。重要なことに、Ultra-Web™ 表面で培養した細胞におけるルシフェラーゼの基底活性(無処理細胞における活性)は、コラーゲン表面またはUltra-Web™ ポリアミン表面で培養した細胞と比較して約2倍高値(図2、パネルA)、バックグラウンドと比較して5倍高値でした。肝細胞の由来および調製方法の変動により影響を受けやすいアッセイフォーマットの場合には、基底状態のシグナルとバックグラウンドのシグナルの差が広がることにより、アッセイの信頼性および感度が向上します。

Ultra-Web™ 表面および Ultra-Web™ ポリアミン表面で培養した細胞では、コラーゲン表面で培養した細胞と比較して高いCYP3A活性が誘導され、Ultra-Web™ 表面で培養した細胞では最も高い活性が誘導されました(図2、パネルBおよびC)。Dex(図2、パネルB) およびPCN(図2、パネルC) 処理により誘導されたCYP3A活性および誘導倍率(基底活性との比較)の傾向は、いずれの表面でも同様でした。誘導活性:基底活性比が3種類の表面のなかで最も高かったのはUltra-Web™ ポリアミン表面でした(23:1)。Ultra-Web™ 表面では、Ultra-Web™ ポリアミン表面より高いCYP活性が誘導されましたが、基底活性も高かったため(図2、パネルA)、誘導倍率はI型コラーゲン表面との有意差を示しませんでした。したがって、Ultra-Web™ 表面は、コラーゲン表面と比較して、基底状態のCYP活性をより頑健に測定でき、既知のラットCYP誘導剤による誘導倍率は同等でした。Ultra-Web™ ポリアミン表面は、基底活性と、2種類の誘導剤により増加する活性の差を最も大きく検出できます。薬物間相互作用に関する最近のFDA指針(7) では、肝細胞におけるCYP誘導の陽性対照について、CYP酵素活性を基底活性より2倍以上上げるものでなければならないと勧告されています。本研究はこのような誘導倍率を満たしており、Ultra-Web™ 表面の使用条件では誘導倍率がさらに向上しました。また、FDA 指針では、CYP誘導のモニタリングに、mRNA測定よりCYP酵素活性の測定を使用すること

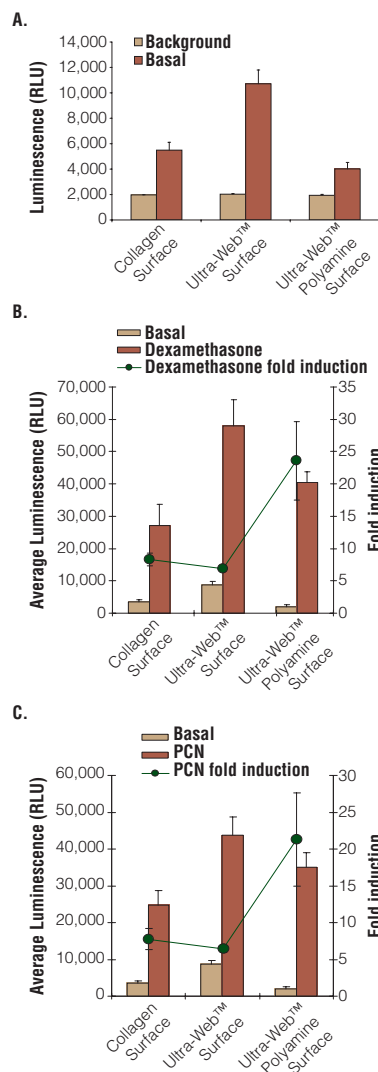


図2. コラーゲンおよび Ultra-Web™ 表面上で培養したラット初代培養肝細胞の CYP3A 活性

凍結保存していたラット初代培養肝細胞 (Xenotech, LLC) を Hepatocyte Culture Medium (HCM, Xenotech) に 1.5×10^5 個/cm² (4.8×10^5 個/ウェル) の密度で懸濁し、96 ウェルのコラーゲンコートプレート (BioCoat™ Collagen I, Discovery Labware)、ならびに Ultra-Web™ または Ultra-Web™ ポリアミンマイクロプレート (Corning) に播種した。翌日、HCMを10μMデキサメタゾン (パネルB)、30μM pregnenolone-16α-carbonitril (PCN, パネルC) または溶媒 (0.1% DMSO, パネルA) を含む HCM に置換することにより、処理を開始した。24時間後、処理用培地を新しいものに交換した。48時間処理後、P450-Glo™ CYP3A4 Assay (カタログ番号V8901) を用いてCYP3A活性を測定した。処理用培地を50 μMルシフェリン-PFBE を含有する培地に交換した。4時間後、培地サンプルとルシフェリン検出試薬を別のプレートで混合し、CYP3A依存性のルシフェリン-PFBEからルシフェリンへの変換量を測定した。発光量は GloMax® 96 Microplate Luminometer (カタログ番号E6501) を用いて測定した。最後に、CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay (カタログ番号G7570) を用いて細胞数を測定し、P450-Glo™ Assay により得られた相対発光量 (RLU) を細胞数に基づき補正した。

が望ましいとされています。P450-Glo™ Assayは、このような勧告に適合する利便性の高いアプローチといえます。

まとめと結論

Corning社のUltra-Web™ 表面プレートは、細胞培養およびセルベースアッセイに便利な合成ナノファイバー表面を提供します。この製品独自の微小環境は、細胞の増殖、分化および生体内の状態に近い応答を促進する機能を有します(3,8-11)。Ultra-Web™ 表面はさまざまなプレートフォーマットに使用することができるため、FLIPR® によるカルシウム流入アッセイ、ルシフェラーゼアッセイ、イメージングアッセイといったセルベースアッセイに最適です。本研究では、3種類の表面がラット肝細胞の生理機能に与える影響を、発光ベースのアッセイフォーマットでシトクロムP450機能を測定することにより検討しました。

- P450-Glo™ Assayを使用することにより、Ultra-Web™ およびUltra-Web™ ポリアミン表面で培養した肝細胞のシトクロム活性が、I 型コラーゲン表面で培養した肝細胞と比較して上昇することが明らかになりました。
- Ultra-Web™ 表面で培養したラット肝細胞におけるCYP3Aの基底活性は、コラーゲン表面で培養した肝細胞と比較して2倍以上高値、バックグラウンドと比較して5倍高値でした。
- Ultra-Web™ 表面では、DexおよびPCNによるCYP3A活性の誘導倍率が5倍と、FDAが勧告する有効な陽性対照誘導剤の条件を上回りました。
- Ultra-Web™ およびUltra-Web™ポリアミン表面ディッシュおよびマイクロプレートは、形態および生理機能を保持させた状態で肝細胞を培養するのに最適な表面を提供します。我々が実施した関連研究では、ラットおよびヒト初代培養肝細胞のCYP1A活性上昇が14日以上にわたり認められたという結果も得られています（現在印刷中）。

参考文献

1. Abbott, A. (2003) *Nature* **424**, 870–2.
2. Steven, M.M. and George, J.H. (2005) *Science* **310**, 1135–8.
3. Schindler, M. *et al.* (2005) *Biomaterials* **26**, 5624–31.
4. Nur-E-Kamal, A. *et al.* (2007) *Molecular and Cellular Biochemistry*, November 16, 2007 (Epub ahead of Print).
5. Dunn, J.C.Y. *et al.* (1991) *Biotechnol. Prog.* **7**, 237–45.
6. Cali, J.J. *et al.* (2006) *Exp. Op. Drug Metab. Toxicol.* **2**, 629–45.
7. FDA Guidance for Industry “Drug Interaction Studies—Study Design, Data Analysis, and Implications for Dosing and Labeling” DRAFT GUIDANCE (September 2006).
8. Nur-E-Kamal, A. *et al.* (2005) *Biochem Biophys. Res. Commun.* **331**, 428–34.
9. Nur-E-Kamal, A. *et al.* (2006) *Stem Cells* **24**, 426–33.
10. Ahmed, I. *et al.* (2006) *J. Biomed. Materials Res. A.* **76**, 851–60.
11. Schindler, M. *et al.* (2006) *Cell Biochem. Biophys.* **45**, 215–27.

製品案内

製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
P450-Glo™ CYP3A4 Assay (Luciferin-PFBE) Cell-Based/Biochemical Assay	10 ml	V8901	17,000
CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay	10 ml	G7570	12,000
GloMax® 96 Microplate Luminometer	1 each	E6501	2,500,000