

肝細胞を用いたミトコンドリア障害に
起因する薬剤性肝毒性評価系の構築

2017年

劉 聡

目次

目次.....	2
第1章 序論.....	5
第2章 ラット初代肝細胞を用いたミトコンドリア毒性の評価.....	8
第1節 序.....	8
第2節 結果.....	9
2-1 Galactose 培養による Rotenone 細胞毒性の増強	9
2-2 Galactose 培養による細胞内エネルギー代謝への影響.....	10
2-3 Galactose 培養及び高濃度酸素による解糖系の抑制.....	10
2-4 Galactose 培養及び高濃度酸素による Rotenone 細胞毒性の増強	12
2-5 Transferrin による酸化ストレスの増悪.....	13
2-6 ラット初代培養肝細胞を用いたミトコンドリア毒性の評価.....	14
第3節 考察.....	21
3-1 Galactose 培地及び高濃度酸素による Crabtree 効果の回避	21
3-2 Transferrin による酸化ストレスの増悪.....	22
3-3 ラット初代培養肝細胞を用いたミトコンドリア毒性の評価.....	23
第4節 小括	27
第3章 ヒト肝細胞を用いたミトコンドリア毒性評価の検討.....	28
第1節 序.....	28
第2節 結果.....	29
2-1 Galactose 培地及び高濃度酸素でのヒト凍結肝細胞の培養.....	29
2-2 ヒト凍結肝細胞を用いたミトコンドリア毒性の評価.....	30
2-3 Galactose 培養及び高濃度酸素による乳酸産生量への影響.....	30
2-4 Galactose 培養による HepaRG 細胞の毒性感受性の増強.....	31
2-5 Galactose 培養による HepaRG 細胞内エネルギー代謝への影響.....	31
2-6 HepaRG 細胞を用いたミトコンドリア毒性の評価.....	33
第3節 考察.....	40
3-1 ヒト凍結肝細胞を用いたミトコンドリア毒性評価の検討.....	40

3-2 HepaRG 細胞を用いたミトコンドリア毒性評価の検討.....	41
第 4 節 小括.....	44
第 4 章 総括.....	45
第 5 章 実験の部.....	47
第 1 節 実験動物.....	47
第 2 節 試薬.....	47
第 3 節 統計解析.....	48
第 4 節 実験方法.....	49
参考文献.....	57
主論文目録.....	62
謝辞.....	63
審査委員.....	64

略語一覽

ATP	Adenosine triphosphate
b-actin	Beta-actin
DILI	Drug-induced liver injury
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
Gala	Galactose
Glu	Glucose
GSH	Glutathione
LDH	Lactate dehydrogenase
MPT	Mitochondrial permeability transition
PCR	Polymerase chain reaction
PDH	Pyruvate dehydrogenase
PK	Pyruvate kinase
ROS	Reactive oxygen species
Sod2	Superoxide dismutase 2
TCA cycle	Tricarboxylic acid cycle
WME	Williams' Media E

第1章 序論

薬剤性肝障害(Drug-Induced Liver Injury, DILI)は、動物実験や臨床試験では発見されることはほとんどなく、医薬品が上市され、より多くの患者さんに使用されて初めて発現する重篤な副作用である。1994年から2006年にかけて、安全性の原因で市場から撤退した薬物の中で薬剤性肝障害が約4割を占めており、医薬品の開発及び安全服用を考える上で重要な問題になっている(Kaplowitz, 2005; Dykens and Will, 2007)。肝臓は生体内のエネルギー産生・貯蔵の中心を担うため、他の臓器と比べて、エネルギー需要が特に高く、ミトコンドリアが多く存在している。Table 1-1で示した重篤な肝障害リスクがある薬物の中で、ミトコンドリア毒性を誘発する薬物は全体の半数以上を占めており、薬物によるミトコンドリア毒性は薬剤性肝障害の発症メカニズムの一つであることが近年報告されている(Dykens and Will, 2007)。また、肝臓以外に、薬物によるミトコンドリア毒性が心臓、骨格筋、神経系統、腎臓における薬物毒性の発症にも関わるということが報告されている(Fukae *et al.*, 2007; Sardao *et al.*, 2008; Gu *et al.*, 2010; Che *et al.*, 2014; Varga *et al.*, 2015)。

ミトコンドリアはGlucoseや脂肪酸などを原料として電子伝達系により生み出された電位差を利用してATPを産生しており、また、ミトコンドリア膜透過性遷移孔(Mitochondrial Permeability Transition Pore)の開口による細胞のアポトーシス誘発においても重要な役割を担っている。薬物によるミトコンドリア毒性のメカニズムは電子伝達系阻害、ATP合成阻害、活性酸素種、ミトコンドリア膜透過性遷移MPT、TCA cycle阻害、脂肪酸 β -酸化の阻害などが挙げられる(Pessayre *et al.*, 2012)。このように多岐にわたる薬物のミトコンドリア阻害機序に対して、従来のミトコンドリア毒性評価は、主に単離ミトコンドリアを用いた呼吸鎖複合体に対する阻害、MPTの誘導で評価されているが、薬物代謝や細胞内生存シグナルによる影響を評価するのが困難であるため、細胞系での評価が重要になった(Brand and Nicholls, 2011)。

生体内ではATPが主にミトコンドリアでの酸化的リン酸化により生成されている。

一方、培養細胞の場合、通常の培地中に Glucose が高濃度存在するため、ミトコンドリアの呼吸が抑制され、ATP の大部分が解糖系で産生され、この現象は Crabtree 効果と呼ばれている(Fu *et al.*, 2013)。そのため、通常の培養条件では、ミトコンドリア障害に起因する細胞毒性が過小評価される問題があった。これに対し、肝がん由来の HepG2 細胞では培地中の Glucose を Galactose に置換することで Crabtree 効果の回避は可能となったことが報告されている(Marroquin *et al.*, 2007)。Galactose が Glucose と比べ、解糖系での ATP 産生が少ないため、細胞内の ATP 産生をミトコンドリアでの酸化的リン酸化にシフトさせることができる。しかし、がん細胞である HepG2 細胞はラット初代肝細胞やヒト肝細胞などの正常肝細胞と比べ、薬物代謝酵素がほとんど発現せず(Wilkening and Bader, 2003; Westerink and Schoonen, 2007; Gerets *et al.*, 2012)、また酸素の要求性が極めて低いことが報告されている(Wagner *et al.*, 2011)。そのため、正常肝細胞を Galactose で培養することで Crabtree 効果を回避できるかの検討が必要である。そこで本研究では、薬物代謝能が長期間維持されるサンドイッチ培養下の正常肝細胞に対し、Crabtree 効果の回避によってミトコンドリア障害を高感度に検出可能となる条件の確立を目的とした。初期検討としてラット初代肝細胞を用い、培地中の Glucose を Galactose に置換した際に、細胞内エネルギー代謝と酸素消費に及ぼす影響などを検討し、ミトコンドリア毒性評価のための条件最適化を行った。更に、ラット初代肝細胞を用いた検討の結果を踏まえて、ヒト肝細胞を用いたミトコンドリア毒性評価系への適用も検討した。

Table 1-1. Drugs with FDA Black Box Warnings for hepatotoxicity and cardiovascular toxicity.

<u>Black Box Warning for Hepatotoxicity</u>		<u>Black Box Warning for Cardiovascular Toxicity</u>	
Abacavir	Dantrolene	Daunorubicin	Arsenic Trioxide
Didanosine	Divalproex	Doxorubicin	Cetuximab
Emtricitabine	Felbamate	Epirubicin	Denileukin diftitox
Entecavir	Naltrexone	Idarubicin	Mitoxantrone
Lamivudine	Nefazodone	Celecoxib	Tamoxifen
Nevirapine	Valproic acid	Diclofenac	Atenolol
Telbivudine	Isoniazid	Diflunisal	Amiodarone (oral)
Tenofovir	Ketoconazole	Etodolac	Disopyramide
Tipranavir	Streptozocin	Fenoprofen	Dofetilide
Stavudine	Trovafloxacin	Ibuprofen	Ibutilide
Zalcitabine	Bosentan	Indomethacin	Amphetamines
Zidovudine		ketoprofen	Atomoxetine
Flutamide		Mefenamic acid	Droperidol
Dacarbazine		Meloxicam	Methamphetamine
Gemtuzumab		Naproxen	Pergolide
Methotrexate		Nabumetone	Bupivacaine
Pentostatin		Oxaprozin	Pioglitazone
Tamoxifen		Piroxicam	Rosiglitazone
		Salsalate	
		Sulindac	
		Thioridazine	
		Tolmetin	

Drugs with documented mitochondrial liabilities are highlighted in bold font.

Data from (Dyken and Will, 2007)

第2章 ラット初代肝細胞を用いたミトコンドリア毒性の評価

第1節 序

序論で述べたように、薬物によるミトコンドリア毒性が薬剤性肝障害の起因の一つとして、近年注目されている。単離ミトコンドリア或いは株化肝細胞(HepG2細胞)を用いた検討が多くなされているが、単離ミトコンドリアが薬物代謝の影響を評価できない、また HepG2 細胞は薬物代謝系酵素がほとんど発現量しないことから、これらの評価系が代謝物の毒性評価やヒトへの外挿性に問題があった。そのため、薬物代謝機能を十分に持っている初代肝細胞を用いたミトコンドリア毒性の試験系の構築が望まれている。そこで本研究では、まず初期検討として、ラット初代培養肝細胞を用いて、培養条件の最適化を行い、初代肝細胞を用いたミトコンドリア毒性評価の可能性を検討した。以前の報告では、通常の培養条件では培地中に存在する高濃度の Glucose と不十分な酸素供給が細胞内のエネルギー産生をミトコンドリアでの酸化的リン酸化からサイトゾルでの解糖系に移行させることが報告された(Fu *et al.*, 2013)。そのため、ミトコンドリア障害に起因する細胞毒性が過小評価された問題があった。本章では、それを改善するために、通常の Glucose 培地を Galactose 培地に置換し、更に酸素濃度を上昇させることでミトコンドリアを活性化し、従ってミトコンドリア障害に対する感受性が増強するかを検討した。まず最初に、ラットから単離した肝細胞をサンドイッチ培養を行い、Glucose 培地、Galactose 培地及び低濃度酸素、高濃度酸素それぞれの培養条件を用いてミトコンドリア機能を活性化する新規培養系を構築し、ミトコンドリア毒性検出感度が向上するかを検討しました。

第2節 結果

2-1 Galactose 培養による Rotenone 細胞毒性の増強

通常の Glucose 培地から Galactose 培地に置換することで、HepG2、HeLa、L6、H9c2、H4IIE、HL60 などのがん細胞において、ミトコンドリアでの酸化的リン酸化を活性化することが報告されているが(Rossignol *et al.*, 2004; Marroquin *et al.*, 2007; Schoonen *et al.*, 2012; Hynes *et al.*, 2013; Dott *et al.*, 2014)、しかし、初代培養細胞において、Galactose 培地で培養する際に細胞内のエネルギー代謝がどう変化するかはまだ報告されていない。本項ではまず、肝細胞において Crabtree 効果が切り替わるのに必要な培養条件の探索を行った。、ラット初代培養肝細胞を用いて、Crabtree 効果の回避の指標として Rotenone 細胞毒性の変化を調べた。Rotenone はミトコンドリア電子伝達系酵素複合体 I の阻害剤であり、複合体 I の阻害によって ATP 量が減少し、ROS 産生が増加し、細胞死が誘導されるため、ミトコンドリアでのエネルギー産生が高まるほど細胞毒性感受性が亢進する(Li *et al.*, 2003)。ラットから単離した肝細胞をサンドイッチ培養を行い、day2、3、4、5 に Glucose 培地を Galactose に置換し、day5 に Rotenone 1 μM と 1.5 μM を曝露し、24 時間後に細胞毒性を測定した (Fig. 2-1A)。その結果、ずっと Glucose 培地で五日間培養した細胞と比べ、Galactose 培地での培養時間と伴い、Rotenone の毒性が上昇し、Galactose 培地で四日間培養した細胞が Rotenone に対して最も高い感受性を示した (Fig. 2-1B)。そのため、以降の検討では Galactose 培地で四日間培養する条件を用いて細胞内エネルギー代謝と毒性感受性の変化を調べた。

単離したラット初代培養肝細胞において細胞播種から Galactose 培地に置換することも検討した。その結果、細胞単離直後に Galactose 培地で培養する際に、24 時間後に嚴重な細胞死の誘導が見られた。そのため、Galactose 培地への置換を day2 に行うことにした。ラットなどの初代培養肝細胞は細胞播種後、プレートに接着する際にエネルギーの需要が極めて高く、この急に上昇したエネルギー需要が Glucose 培地では解糖系で速やかに供給できる。一方、Galactose 培地の場合は解糖系での ATP 産生が抑制され、同時に、細胞の接着が多くエネルギーを消費し、結局、細胞速やかにエネルギーを生成できないため、ATP の枯渇による細胞死が誘導されたことが推察された。

2-2 Galactose 培養による細胞内エネルギー代謝への影響

Galactose が解糖系における ATP 産生が少ないため、細胞内 ATP 量を維持するために代償的にミトコンドリアでの酸化的リン酸化を活性化させる(Marroquin *et al.*, 2007)。次に、この現象がラット初代培養肝細胞でも見られるかを検証した。まず Galactose 培養による細胞内 ATP 量への影響について調べた。ラット初代培養肝細胞は day2 から Glucose 培地から Galactose 培地に置換し、その後それぞれの培地で day5 まで五日間培養した。細胞内 ATP 量が Glucose 培地で培養した細胞と比べ、Galactose 培養によって、10%ぐらいの低下が見られた (Fig. 2-2)。このことから、ラット初代培養肝細胞は Galactose で培養した際に、細胞内 ATP 量が Glucose で培養する際の ATP 量の 80%-90%が維持されることが明らかとなった。

肝細胞では、Galactose は解糖系に入るまで 2 分子の ATP を消費し、(Voet and Voet, 2011)、一方、Glucose が G6P (Glucose-6-phosphate)までの代謝が ATP の消費が少ないため、Galactose と比べ、解糖系での ATP 生成効率が高いと言われている。そのため、HepG2 などの培養細胞において、Galactose で培養する際に、細胞内の ATP 量を維持するために、ATP の産生が解糖系からミトコンドリアでの酸化的リン酸化に移行させることが知られている(Marroquin *et al.*, 2007)。そこで、ラット初代培養肝細胞においても同様な変化が見られるかを検証するために、Galactose で培養する際に、ミトコンドリアの電子伝達系で ATP 産生の際に消費される酸素の消費速度の変化を調べた。その結果、通常の Glucose 培地で培養した細胞と比べ、Galactose 培養により、ミトコンドリアでの ATP 産生の指標である酸素消費速度の亢進が見られた (Fig. 2-3)。このことから、Galactose で培養した際に、ミトコンドリアでの ATP 産生が亢進し、細胞の酸素要求性が増加していると推定された。

2-3 Galactose 培養及び高濃度酸素による解糖系の抑制

Glucose が解糖系を介してピルビン酸になり、嫌気呼吸の条件下で主に乳酸になるため、乳酸の生成量が嫌気呼吸活性の指標としてよく使われている。Galactose 培養による解糖系活性への変化を調べるために、単離したラット初代培養肝細胞を Fig. 2-2A

で示したタイムコースで酸素濃度 20%で、Glucose 培地及び Galactose 培地で五日間培養し、24 時間以内で放出された乳酸量の経日変化を測定した。その結果、day2 に放出された乳酸の量が day1 と比べ、有意に減少した(Fig. 2-4)。この減少は day2 に planting 用培地から culturing 用培地への置換によるものだと考えられる。Day2 から、Glucose 培地及び Galactose 培地いずれの培地で培養した細胞が培養日数と伴って、乳酸産生量が上昇した。この乳酸産生量の上昇が以前の Fu らの報告と一致し、単離したラット初代培養肝細胞が培養開始後、細胞内のエネルギー代謝が徐々にミトコンドリアでの酸化的リン酸化から解糖系に移行することが示唆された(Fu *et al.*, 2013)。Glucose 培地で培養した細胞においては day5 の乳酸産生量が day1 の 95.5%に回復した。一方、Galactose 培地で培養した細胞においては day2 の乳酸産生量が day1 の 65.8%に低下し、その後、day5 まで毎日ほぼ同程度の乳酸が放出された。以上の結果から、ラット初代培養肝細胞において、通常の Glucose 培地で培養した際に細胞内の ATP 産生が徐々にミトコンドリアでの酸化的リン酸化から解糖系に移行し、また、Galactose 培地に置換した際に、ラット初代培養肝細胞は HepG2 などのがん細胞と同様に、細胞内の ATP 産生が徐々に解糖系からミトコンドリアでの酸化的リン酸化に移行させることが明らかとなった。

通常の培養条件下では、飽和密度で初代肝細胞を培養した場合、気液界面からの培養液相中の拡散による酸素供給速度 (17 pmol/s/cm^2) は、酸素消費速度 ($40\text{-}90 \text{ pmol/s/cm}^2$) を満たすことができないことが報告されている(Fig. 2-5A) (Evenou *et al.*, 2010)。そのため、ラット初代培養肝細胞において、通常培養条件下での ATP 産生が解糖系への転換の起因は、高濃度 Glucose による Crabtree 効果以外に、培養液の厚さによる酸素拡散の阻害も考えられる(Bader *et al.*, 1999)。次に、初代肝細胞の酸素消費速度が通常の酸素供給速度の 4 倍であり、細胞の酸素消費速度を満たすために、インキュベーター内の酸素濃度を 20%から 80%に上昇させ、ラット初代培養肝細胞のエネルギー代謝及びミトコンドリア毒性を有する薬物に対する感受性の変化を調べた。単離したラット初代培養肝細胞は播種後、直ちに酸素濃度 20%と 80%に設定したインキュベーター内で培養し、翌日にそれぞれの酸素濃度で培養した細胞に更に Glucose 培地または Galactose 培地で培養し、嫌気呼吸の指標とした乳酸産生量の経日変化を調べた。その結果、Fig. 2-4 で示したように、酸素濃度 20%、Glucose 培地で培養した細

胞においては day1 の乳酸産生量が 247 $\mu\text{g/ml}$ であり、一方、酸素濃度 80%にした際に、Glucose 培地で培養した細胞からの day1 の乳酸産生量が 39.7 $\mu\text{g/ml}$ に低下した。また培養に伴って、酸素濃度 80%、Glucose 培地で培養した細胞から放出した乳酸が day2 の 91.4 $\mu\text{g/ml}$ から day5 の 199 $\mu\text{g/ml}$ に上昇した。一方、酸素濃度 80%、Galactose 培地で培養した細胞の場合、Glucose 培地より、緩やかな乳酸産生量の上昇がみられた(day2 の 44.6 $\mu\text{g/ml}$ から day5 の 93.2 $\mu\text{g/ml}$ に上昇)。以上の酸素濃度 20%/Glucose 培地、酸素濃度 20%/Galactose 培地、酸素濃度 80%/Glucose 培地、酸素濃度 80%/Galactose 培地、4 条件で培養した細胞の中で、酸素濃度 80%、Galactose 培地で培養した細胞からの day5 の乳酸産生量は最も低いことが明らかとなった。以上の結果から、ラット初代培養肝細胞において、Galactose 培地への置換に加えて、酸素濃度を上昇させることで Crabtree 効果の回避が可能となることが示された。

2-4 Galactose 培養及び高濃度酸素による Rotenone 細胞毒性の増強

次に、細胞内のエネルギー代謝がミトコンドリアでの酸化的リン酸化に偏った際に、ミトコンドリア毒性に対する感受性が増強するかを検討した。酸素濃度 20%・80%、及び Glucose 培地・Galactose 培地、種々の条件下で培養した細胞に電子伝達系酵素複合体 I を阻害する rotenone を曝露し、細胞毒性の変化を調べた。その結果、酸素濃度 20%と 80%、何れの条件下においても、Glucose 培地から Galactose 培地に置換することで rotenone 細胞毒性の増強が見られた。また、Glucose 培地と Galactose 培地何れの条件下で、酸素濃度 20%から 80%に上昇した際に、rotenone 細胞毒性の増強が見られた(Fig. 2-5)。更に、酸素濃度 20%/Glucose 培地で培養した細胞が rotenone に対して最も低い感受性を示した。一方、酸素濃度 80%/Galactose 培地で培養した細胞が rotenone に対して最も高い感受性を示した。これらの結果より、Galactose 培地、80%酸素濃度でラット初代肝細胞を培養することで、Crabtree 効果の回避によりミトコンドリア活性を高く維持し、従って、ミトコンドリア毒性感受性も増強させたことが明らかとなった。

2-5 Transferrin による酸化ストレスの増悪

薬物に誘発された活性酸素種(reactive oxygen species, ROS)は薬物に起因するミトコンドリア毒性の原因の一つとして知られている(Pessayre *et al.*, 2012)。そこで、ROS 生成の増幅を目的として、鉄イオンの輸送を担う transferrin を rotenone と共に細胞に曝露し、ROS の生成とその時の細胞毒性感受性の変化について検討した(Fig. 2-6) (Brieland *et al.*, 1992)。細胞毒性の検討では、上記で述べた酸素濃度 20%・80%、及び Glucose 培地・Galactose 培地、種々の条件下で培養した細胞に対し、day5 に rotenone と transferrin を同時に 24 時間曝露し、細胞毒性の変化を調べた。その結果、Glucose 培地、Galactose 培地何れの条件下で、酸素濃度 20%から 80%に上昇した際に、rotenone 細胞毒性の増強が見られ(Fig. 2-7A、B ; 参照 Triangles ‘20% oxygen’ vs. circles ‘80% oxygen’)、何れの条件下で、transferrin の添加により rotenone の細胞毒性が更に増強したことが明らかとなった(Fig. 2-7、B ; 参照 open symbols ‘transferrin-’ vs. filled symbols ‘transferrin +’)。

ROS 生成量の検討では、上記で述べた種々の条件下で培養した細胞に対し、day5 にまずは鉄イオンを loading させるために、transferrin を添加した all free Glucose (William’s E medium with no supplement)培地と all free Galactose(Galactose based William’s E medium with no supplement)培地で 12 時間インキュベーションし、次に rotenone と transferrin を同時に 12 時間曝露し、その後 ROS の産生量を測定した。その結果、細胞毒性の結果と同様に、Glucose 培地及び Galactose 培地の何れの条件下で、酸素濃度 20%から 80%に上昇した際に、rotenone 曝露時の ROS 生成量が上昇した(Fig. 2-7C、D ; 参照 triangles ‘20% oxygen’ vs. circles ‘80% oxygen’)。また、何れの条件下で、transferrin の添加により rotenone 曝露時の ROS 生成量が更に増強したことが明らかとなった(Fig. 2-7C、D ; 参照 open symbols ‘transferrin-’ vs. filled symbols ‘transferrin +’)。以上から、Transferrin が細胞内の貯蔵鉄を増加させ、フェントン反応により生じた ROS が毒性を増強することが示唆された。また、Galactose 培地で培養した細胞が Glucose 培地で培養した細胞と比べ、rotenone 曝露時の ROS 生成量が更に増強したことが明らかとなった(参照 Fig. 2-7C ‘Glucose’ and Fig. 2-7D ‘Galactose’)。

2-6 ラット初代培養肝細胞を用いたミトコンドリア毒性の評価

以上の検討から、Galactose 培地、酸素濃度 80%、Transferrin ありの条件下で培養した細胞がミトコンドリア毒性に対する感受性が最も高く、一方で、Glucose 培地、酸素濃度 20%、Transferrin なしの条件下で培養した細胞がミトコンドリア毒性に対する感受性が最も低いことが明らかとなった。そこで、ミトコンドリア毒性に対する感受性が最も高い培養条件と感受性が最も低い培養条件の二条件で培養したラットサンドイッチ培養肝細胞を用いて、ミトコンドリア毒性の評価系を構築し、ミトコンドリア毒性を有する 14 化合物を用いて評価系の有用性について検証した。具体的には、それぞれの薬物について両条件下での TC_{50} を求め、その比を算出し、ミトコンドリア毒性のポテンシャルの指標とした。その結果、Galactose 培地、酸素濃度 80%、Transferrin ありの条件下で培養することで、Glucose 培地、酸素濃度 20%、Transferrin なし条件下で培養した細胞と比べ、多くの被験化合物は Galactose 培養により毒性の増強が見られた(Fig. 2-8)。

次に、それぞれの TC_{50} とその比を算出し、その結果、ミトコンドリア電子伝達系酵素複合体 I の阻害活性を持つ化合物 Amiodarone、Rotenone、Phenformin、Flutamide、Metformin、Ketoconazole は相対的に高い TC_{50} の比が算出された(Table 2-1)。また、酸化ストレスを誘発する薬物の中で、Nortriptyline を除き、Amitriptyline、Imipramine も高いミトコンドリア毒性のポテンシャルを持つことが示唆された(Table 2-1)。一方、Troglitazone、Benzbromarone、Diclofenac は、本評価系ではミトコンドリア毒性に起因した細胞毒性の増強は検出されなかった(Table 2-1)。その原因として、これらの薬物は典型的な MPT 誘発薬物であり、MPT に起因する細胞毒性への寄与が大きいことが推察された。以上の結果から、ミトコンドリア毒性に対する感受性が高い条件と低い条件で培養したラット初代培養肝細胞において、MPT 誘発薬物を除くミトコンドリア障害誘発薬物が検出可能となることが明らかとなった。

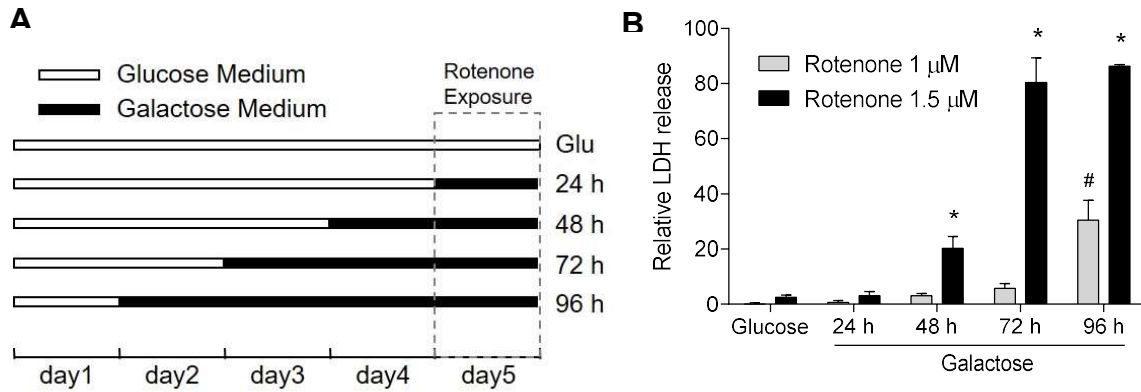


Fig. 2-1. Effect of different culture periods using glucose or galactose medium on the susceptibility of rat primary hepatocytes to the mitochondrial toxin rotenone. After isolation, rat hepatocytes were first cultured in glucose medium for 24 h, and then glucose medium was substituted with galactose medium from days 2, 3, 4 or 5. Cells were treated with rotenone (1 and 1.5 μ M) for the last 24 h (A) and the LDH release was measured using Triton X-100-treated cells as a control for maximum release (high control). Data are means \pm SD, n=3, * p <0.05 vs. glucose control treated with 1.5 μ M rotenone, # p <0.05 vs. glucose control treated with 1 μ M rotenone. Statistical analysis was performed using ANOVA followed by Dunnett's test.

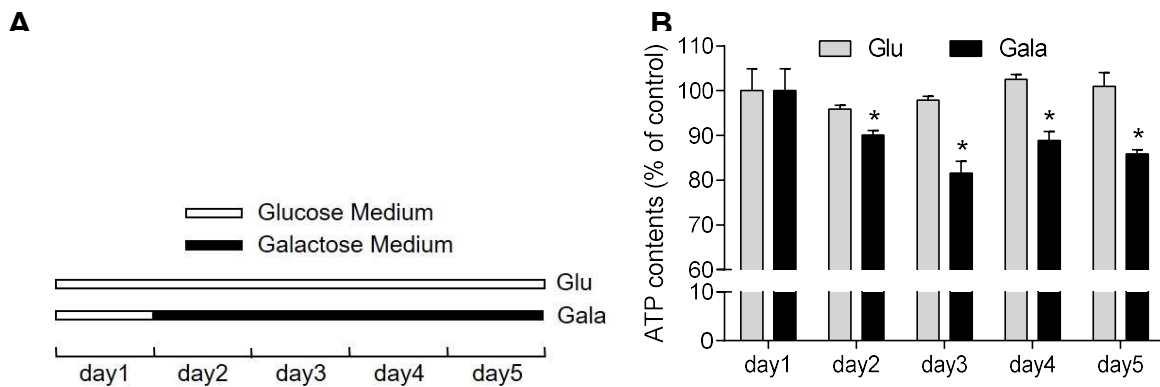


Fig. 2-2. Effect of substituting medium glucose with galactose on cellular ATP contents. After isolation, cells were cultured in glucose medium for the first 24 h. From day 2, cells were cultured in glucose or galactose and ATP was measured daily for 5 days (A). Data were normalized to the ATP content of day 1 (100%). Data are means \pm SD, n=3, * p <0.05 vs. the ATP content of cells cultured in glucose medium on each day. Statistical analysis was performed using ANOVA followed by LSD test.

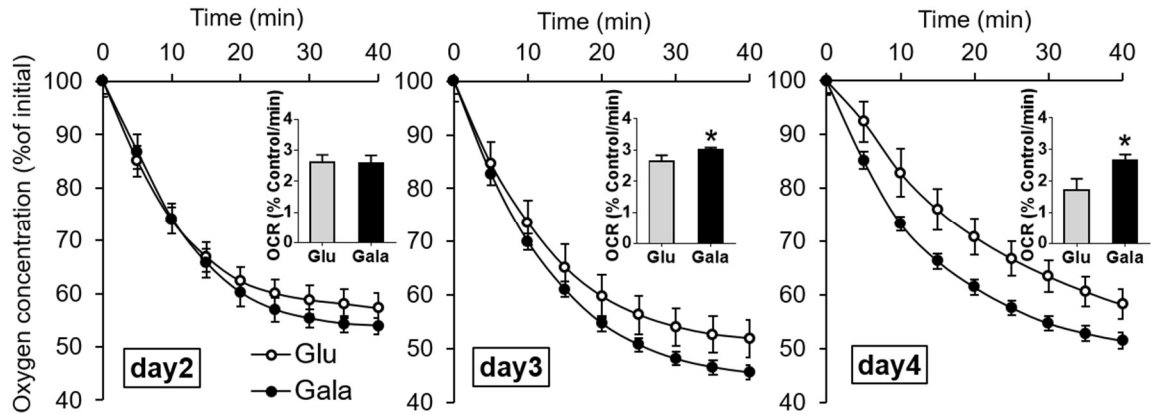


Fig. 2-3. Oxygen consumption of primary rat hepatocytes cultured in glucose-based (open symbol) or galactose-based (filled symbol) medium. Cells were cultured as mentioned in Fig. 2-2A. The oxygen concentration was measured after replacing the medium with fresh medium. The oxygen consumption rate (OCR) was calculated as the absolute value of the initial consumption rate. Data were normalized to the initial oxygen partial pressure (pO_2) in the medium (100%). The initial pO_2 in medium on each day is day2 (Glu $13.71 \pm 0.32\%$; Gala $14.09 \pm 0.41\%$), day3 (Glu $14.69 \pm 0.34\%$; Gala $15.91 \pm 0.15\%$) and day4 (Glu $14.22 \pm 0.33\%$; Gala $16.11 \pm 0.44\%$). Data are means \pm SD, $n=12$, * $p<0.05$ vs. glucose. Statistical analysis was performed using Student t-test.

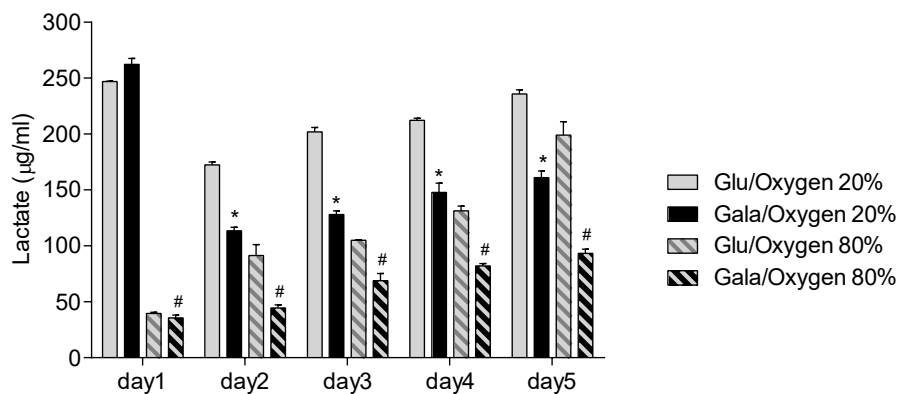


Fig. 2-4. Effect of substituting medium glucose with galactose in hyperoxia on extracellular lactate release. Primary rat hepatocytes were cultured as mentioned in Fig. 2-2A in 20% or 80% oxygen. Glucose and galactose media were changed every day, and the lactate released into the medium within 24 h was measured. Data are mean \pm SD, $n=3$, * $p<0.05$ glucose/20% oxygen vs. galactose/20% oxygen on each day; # $p<0.05$ vs. galactose/20% oxygen vs. galactose/80% oxygen on each day. Statistical analysis was performed using ANOVA followed by LSD test.

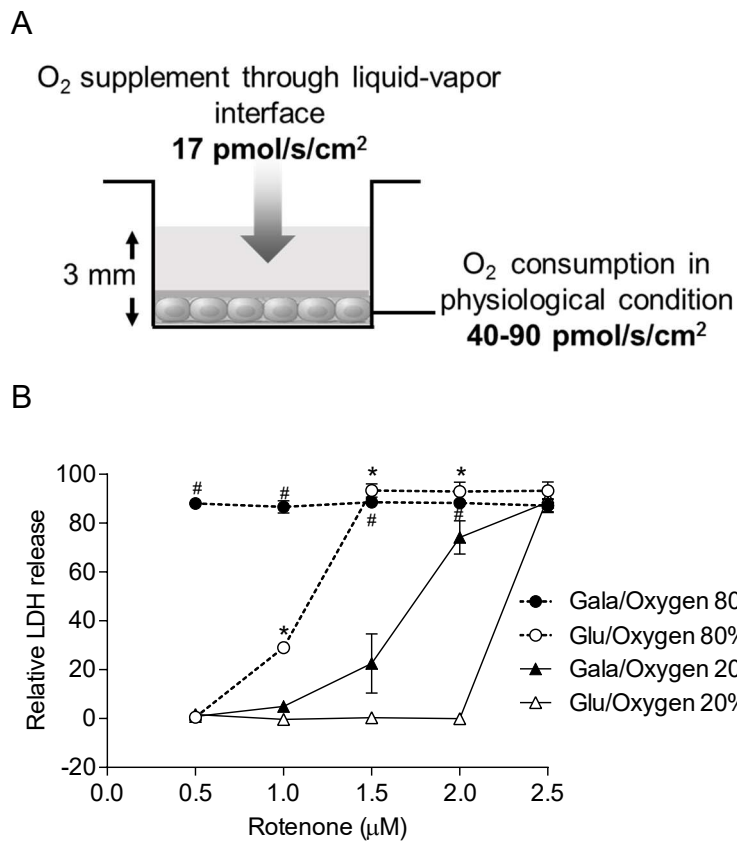


Fig. 2-5. Oxygen supplement through liquid-vapor interface cannot meet the oxygen consumption rate of primary hepatocytes in physiological condition which lead cells suffer hypoxia (A). Effect of hyperoxia on the sensitivity of rat hepatocytes cultured in glucose or galactose to rotenone (B). Cells were cultured as mentioned in Fig. 2A in 20% or 80% oxygen. Rotenone was added to cells cultured in each condition for the last 24 h and the LDH release was measured using Triton X-100-treated cells as a control for maximum release (high control). Data are means \pm SD, n=3. * $p < 0.05$, Gala/Oxygen 20% vs. Gala/Oxygen 80% (filled symbol); # $p < 0.05$ Glu/Oxygen 20% vs. Glu/Oxygen 80% (open symbol). Statistical analysis was performed using ANOVA followed by LSD test.

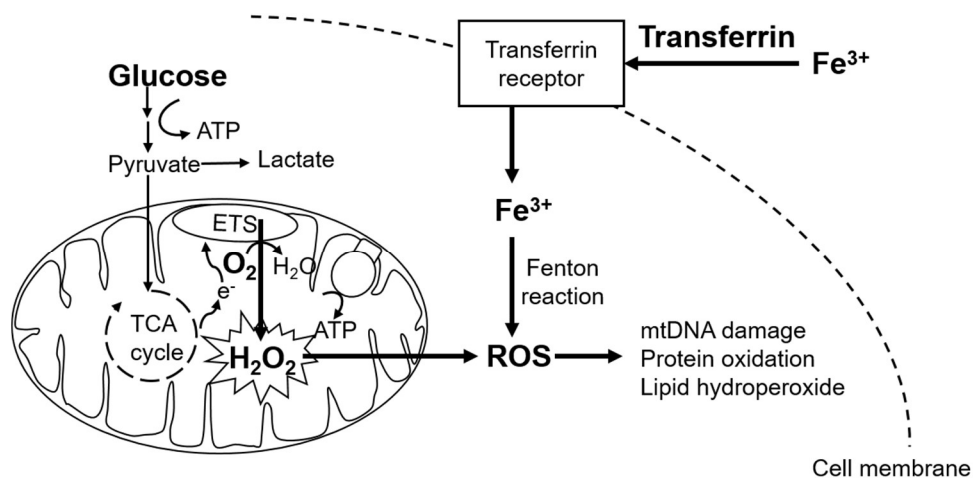


Fig. 2-6. Transferrin mediated enhanced iron uptake can increase ROS generation through Fenton reaction.

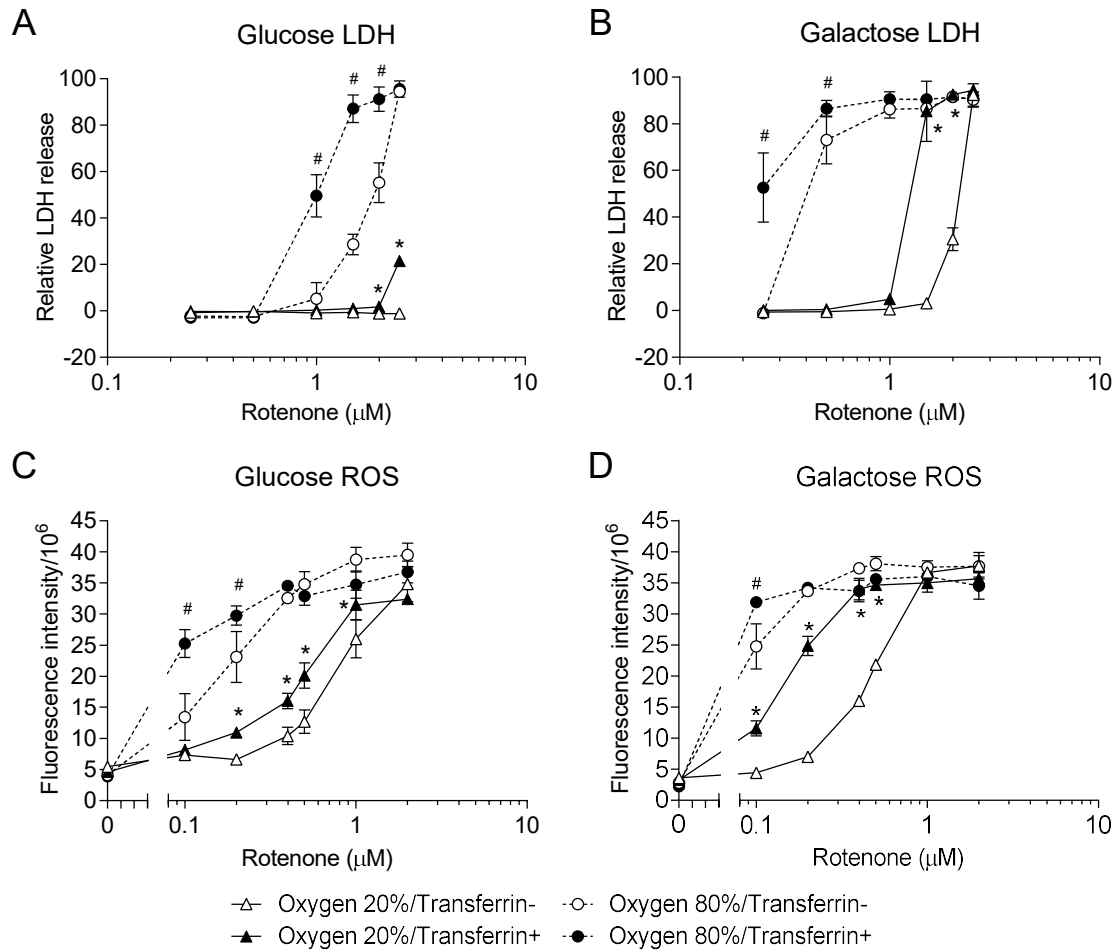


Fig. 2-7. Effect of transferrin on the sensitivity of primary rat hepatocytes to rotenone and ROS generation. Cells were cultured in 20% or 80% oxygen as mentioned in Fig. 2A. Rotenone was added to cells cultured in each condition in the presence of transferrin in the last 24 h and the LDH release was measured using Triton X-100-treated cells as a control for maximum release (high control) (A, B). To measure ROS generation, cells were cultured as in the LDH assay until day 4. On day 5, cells were pre-incubated with 6.25 μg/ml transferrin in the first 12 h. Then rotenone was added in the presence of transferrin for 12 h and the ROS production was measured (C, D). Data are means ± SD, n=3. * $p < 0.05$, Oxygen 20%/Transferrin- vs. Oxygen 20%/Transferrin+; # $p < 0.05$ Oxygen 80%/Transferrin- vs. Oxygen 80%/Transferrin+. Statistical analysis was performed using ANOVA followed by LSD test.

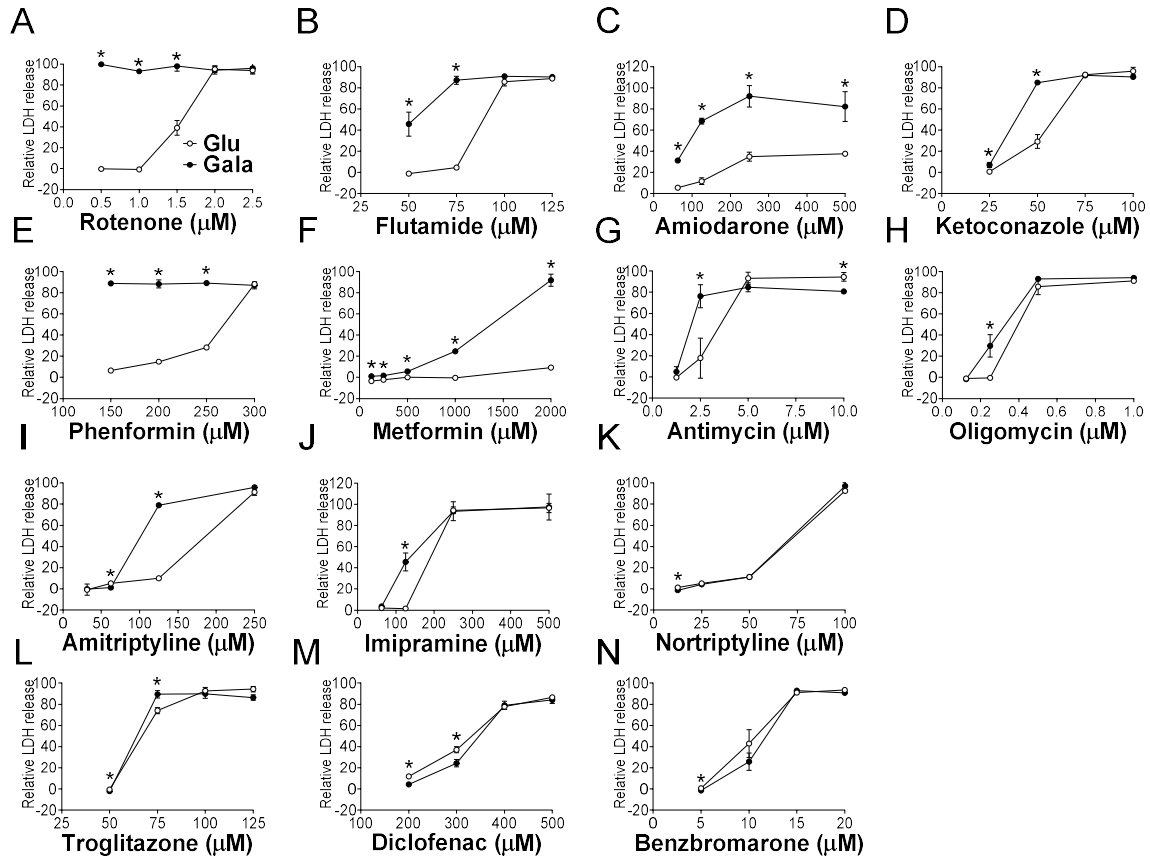


Fig. 2-8. Dose-responses for primary rat hepatocytes cultured in glucose/20% oxygen without transferrin (open symbol) or galactose/80% oxygen with transferrin (filled symbol) treated with several drugs that could impair mitochondrial function. Cells were cultured as mentioned in Fig. 2A in 20% or 80% oxygen and treated with drugs for the last 24 h. LDH release was measured using Triton X-100-treated cells as a control for maximum release (high control). Data are means \pm SD, $n=3$, * $p<0.05$ vs. Glucose/20% oxygen without transferrin.

Table 2-1. TC₅₀ values (μM) of test compounds in rat primary hepatocytes cultured in glucose/20% oxygen without transferrin or galactose/80% oxygen with transferrin

	TC _{50,Glu} (μM)	TC _{50,Gala} (μM)	TC _{50,Glu} / TC _{50,Gala}
Amiodarone	>500	121.1	>4.1
Rotenone	1.5	<0.5	>3.0
Amitriptyline	175.7	96.5	1.8
Phenformin	267.1	<150.0	>1.8
Imipramine	215.0	128.9	1.7
Flutamide	85.3	52.2	1.6
Metformin	>2000	1299	>1.5
Oligomycin	0.4	0.3	1.4
Antimycin	3.0	2.1	1.4
Ketoconazole	54.3	45.3	1.2
Nortriptyline	69.6	68.4	1.0
Troglitazone	64.1	63.0	1.0
Benzbromarone	10.2	10.3	1.0
Diclofenac	323.7	326.3	1.0

Test compounds were ranked by the order of TC_{50,Glu}/ TC_{50,Gala} which was calculated as an index of the potency of mitochondrial toxicity. TC₅₀ values were calculated using four-parameter method (Graph Pad Software, San Diego, CA) or approximately estimated using the formula: $TC_{50} = 10^{(\text{Log}(A/B) \times (50-C) / (D-C) + \text{Log}(B))}$ (A: Corresponding concentrations of test compound directly above 50% inhibition; B: Corresponding concentrations of test compound directly below 50% inhibition; C: % inhibition directly below 50% inhibition; D: % inhibition directly above 50% inhibition)(Arita-Moriok *et al.*, 2015).

第3節 考察

3-1 Galactose 培地及び高濃度酸素による Crabtree 効果の回避

ラット初代培養肝細胞は通常培養条件下で、長期間の培養に伴って、細胞内のエネルギー代謝が徐々にミトコンドリアでの酸化的リン酸化から解糖系に移行することが知られており、その起因は通常培地に存在する高濃度の Glucose と不十分な酸素供給だと考えられる(Bissell *et al.*, 1978; Ainscow and Brand, 1999; Diaz-Ruiz *et al.*, 2011; Sakai *et al.*, 2012)。このような細胞内 ATP 産生が解糖系に偏った細胞では、ミトコンドリアでの酸化的リン酸化によるエネルギー産生が低下しているため、ミトコンドリア毒性に対する感受性も低下しうると考えられる。このような解糖系に偏っているエネルギー代謝を再びミトコンドリアでの酸化的リン酸化に移行させ、細胞のミトコンドリア毒性に対する感受性を増強させるために、まず、培地中の Glucose を Galactose に置換することについて検討した。肝細胞では、Galactose は galactokinase により ATP でリン酸化され、生じた Galactose-1-phosphate (G1P)が Galactose-1-phosphate uridylyl transferase で UDP-Glucose の uridylyl group と反応し、UDP-Galactose と G1P が生じる。G1P が更に phosphoglucomutase により解糖中間体 G6P に変え、結局、Galactose が 2 分子の ATP を消費し、G6P に変え、解糖系に入る(Voet and Voet, 2011)。この時、Glucose の解糖代謝と比べ、Galactose が解糖系における ATP 産生が少ないため、Galactose で培養する際に、細胞内の ATP 量を維持するために、代償的に細胞内のエネルギー産生がミトコンドリアでの酸化的リン酸化に移行する。今回の検討では、ラット初代培養肝細胞において、Galactose 培地で培養する際に細胞内の ATP 量は Glucose 培地で培養する際の ATP 量をほぼ維持できることが明らかとなった (Fig. 2-2)。更に、Galactose 培養によって、ミトコンドリアでの ATP 産生の指標となる酸素消費速度が上昇し (Fig. 2-3)、嫌気呼吸活性の指標となる乳酸の産生量が低下した (Fig. 2-4)。また、細胞に電子伝達系酵素複合体 I を阻害する rotenone に対する感受性も Galactose 培養によって増強したことが明らかとなった (Fig. 2-5)。以上の結果から、以前はがん細胞でしか見られなかった Galactose 培養時のミトコンドリアの活性化は、ラット初代培養肝細胞においても確認し、従ってミトコンドリア毒性に対する感受性も増強し、Galactose 培地で培養したラット初代肝細胞がミトコンドリア毒性評価での

有用性が示唆された。

通常培養条件下での不十分な酸素供給が培養肝細胞におけるエネルギー代謝の解糖系への移行の起因の一つとして知られている。そこで、我々はインキュベーター内の酸素濃度を 80%に上げることで、細胞への酸素供給を増強させ、従って、細胞のミトコンドリア毒性に対する感受性が増強させるかを検討した。ラット初代培養肝細胞を酸素濃度 80%で培養することで rotenone に対する感受性が有意に増強したことが明らかとなった(Fig. 2-5)。また、高濃度酸素で培養する際に、乳酸産生量の低下(Fig. 2-4)と rotenone に誘発した ROS 産生が増強したことから(Fig. 2-7C and Fig. 2-7D)、高濃度酸素培養による毒性感受性の増強がミトコンドリアでの酸化リン酸化の活性化によるものだと考えられる。通常の培養条件下では、気液界面からの培養液相中の拡散による酸素供給速度 (17 pmol/s/cm^2) は、酸素消費速度 ($40\text{-}90 \text{ pmol/s/cm}^2$) の約 1/4 であり(Stevens, 1965; Evenou *et al.*, 2010)。そのため、インキュベーター内の酸素濃度を通常の 20%から 4 倍を上げ、80%に設定することで、生体内の正常な酸素消費速度を満たせると考えられる。以上のことをまとめて、ラット初代培養肝細胞においては Galactose 培地への置換に加えて、酸素濃度を上昇させることで Crabtree 効果の回避が可能となり、従ってミトコンドリア毒性に対する感受性も増強したことが示された。

3-2 Transferrin による酸化ストレスの増悪

肝細胞内ではミトコンドリア、ミクロソーム、ペルオキシソームなどの種々の小器官で様々な酵素反応が行われ、それに伴って活性酸素種が生成する。このうち、特にミトコンドリア内膜では各種呼吸鎖複合体により大量の電子が処理され、電子の漏出を介して ROS の生成に繋がり得ることが考えられる。通常、生体内では約 1-2%の酸素が cytochrome c oxidase により還元され、その後、superoxide anion を経て superoxide dismutase によって hydrogen peroxide になる(Kowaltowski and Vercesi, 1999)。薬物に誘発した ROS の産生が酸化ストレスの原因となり、また、酸化ストレスは薬剤性肝障害の起因の一つとして知られている(Pereira *et al.*, 2012)。生体内では通常、電子伝達系から生成された hydrogen peroxide が直ちにグルタチオンなどの抗酸化物質により除

去されるが、ミトコンドリア障害が起こる際に、ROS 産生量が抗酸化物質の除去能力を超えた場合に、大量な ROS が酸化ストレスを引き起こし、最終的に細胞死が誘発される可能性がある(Kowaltowski and Vercesi, 1999)。鉄イオンの存在下で、hydrogen peroxide が更に hydroxyl radicals (OH•) または ferryl ion (FeO²⁺)に変え、これらの ROS が hydrogen peroxide より反応性が高いことが知られている(Sekine *et al.*, 2015)。Transferrin は血漿に含まれるタンパク質の一種で、鉄イオン (Fe³⁺) を結合し、その輸送を担っている。培地中に transferrin を加えることは、細胞内への鉄イオンの取り込みを促進する有用な手段であることが知られている(Brieland *et al.*, 1992)。そこで、我々は細胞の薬物による酸化ストレスに対する感受性を増強する目的とし、種々の条件下で培養したラット初代培養肝細胞に被験薬物を transferrin と同時に曝露し、細胞毒性の変化を調べた。その結果、transferrin の添加により、電子伝達系呼吸鎖複合体 I の阻害剤である rotenone の細胞毒性の増強が確認し、ROS の産生量も細胞毒性と同様に transferrin の添加により増強することが明らかとなった(Fig. 2-7)。また、ROS 産生量の増加は Transferrin の添加以外に、Glucose 培地から Galactose 培地への置換、インキュベーター内の酸素濃度を 20%から 80%に上げる際においても見られた (Fig. 2-7C, D)。この ROS 産生の増加は Galactose または高濃度酸素で培養した際にミトコンドリアの活性化によるものだと考えられる。

3-3 ラット初代培養肝細胞を用いたミトコンドリア毒性の評価

ミトコンドリア毒性の評価系は、ミトコンドリア毒性に対する感受性が最も高い培養条件と感受性が最も低い培養条件の二条件で培養したラット初代培養肝細胞を用いて構築した。次に、ミトコンドリア毒性を有する 14 化合物を用いて評価系の有用性を検証した(Fig. 2-8)。ミトコンドリア毒性がそれぞれの被験薬物の両条件下で求めた TC₅₀ の比で評価した (Table 2-1.)。被験薬物の中で、典型的なミトコンドリア電子伝達系酵素複合体 I の阻害剤 rotenone と複合体 I の阻害活性を持つ被験薬物 flutamide (Fau *et al.*, 1994)、amiodarone (Fromenty *et al.*, 1990)、phenformin、metformin (Dykens *et al.*, 2008)が Galactose 培地、酸素濃度 80%、Transferrin ありの条件下で培養することで、細胞毒性が有意に増強した。中では、ビグアナイド系の抗糖尿病薬である

phenformin と metformin は臨床上、薬物投与による乳酸アシドーシスの発症が問題になっており、その発生機序は、ビグアナイド薬が肝細胞のミトコンドリア細胞膜に結合し、酸化リン酸化を阻害することにより NADH が上昇し、TCA サイクルの活性や PDH の低下が起こり、乳酸産生の亢進が起こること、また、肝細胞での糖新生の抑制によりピルビン酸が蓄積し、その結果、乳酸の増加が起こるためと考えられる。臨床では phenformin は metformin より乳酸アシドーシスの発症リスクが高く、市場から撤退している。今回、我々のスクリーニングの結果においては、phenformin が metformin と比べ、相対的に高い肝毒性リスクが検出され、この結果が以前のヒト初代肝細胞の結果、または臨床上の肝毒性リスクと一致した(Dykens *et al.*, 2008)。Phenformin と metformin は両方同程度のミトコンドリア酸化リン酸化の阻害活性を持っているが、臨床では phenformin の肝毒性リスクが高い原因としては、phenformin と metformin のミトコンドリア内蓄積の違いによるものだと考えられる。Phenformin と metformin は両方ミトコンドリア表面に存在する organic cation/carnitine transporter 1 (OCTN1) と organic cation transporter (Oct1) の基質となることが報告され、しかし、phenformin が metformin より取り込みが多く、ミトコンドリア内の蓄積 metformin より phenformin の方が多いため、phenformin の酸化リン酸化の阻害活性が高くなることが報告されている(Wang *et al.*, 2003; Shitara *et al.*, 2013)。

上記で述べたように、ミトコンドリア電子伝達系酵素複合体 I の阻害活性を有する薬物に対し、今回構築した評価系が高感度に検出され、一方、複合体 III の阻害剤である Antimycin と複合体 V (ATP synthase) の阻害剤である Oligomycin に対し、Galactose 培地、酸素濃度 80%、Transferrin ありの条件下で培養した際に、毒性の増強が限定的であり、それぞれの電子伝達系酵素複合体の阻害剤に対して、ラット初代培養肝細胞は異なった感受性を示した。その原因は正常なラットから単離した初代肝細胞は ATP 枯渇 (例えば antimycin、oligomycin を曝露した際) より、酸化ストレスに起因する細胞毒性(例えば rotenone を曝露した際) に対して感受性が高いと推察された。電子伝達系酵素複合体 I が ROS 産生の主な場所として知られており、それが阻害された際には複合体 III や複合体 V と比べ、より多くの ROS が生成することが知られている(Lenaz, 1998)。そのため、初代肝細胞において、複合体 I の阻害に対する毒性の感受性が相対的に高いことは合理的であると考えられる。しかし、初代肝細胞において ATP の枯渇

と酸化ストレスに起因する細胞毒性に対する感受性の違いについての報告がまだないため、更なるの検証が必要である。また、初代肝細胞と比べ、ヒト肝がん由来の HepG2 細胞は電子伝達系酵素複合体 I、III、V に対して、何れも高い感受性を示した (Marroquin *et al.*, 2007)。この細胞種によって、種々の電子伝達系酵素複合体に対して示した異なった感受性の原因はまだ不明である。原因として一つ考えられるのはミトコンドリアでの好気呼吸は活性化された際に、呼吸基質が初代細胞とがん細胞で異なる可能性がある。

Ketoconazole は真菌症の治療に使用されるイミダゾール系合成抗真菌薬の一種であり、電子伝達系酵素複合体 I の阻害活性が報告されている (Rodriguez and Acosta, 1996)。しかし、上記の rotenone や phenformin など複合体 I 阻害活性を有する薬物と比べ、両条件で培養した細胞において ketoconazole が相対的に弱い細胞毒性の増強が示された。その原因としては、ketoconazole の毒性メカニズムが複合体 I の阻害活性以外に、細胞内グルタチオン量の低下 (Rodriguez and Buckholz, 2003)、ステアトシス (Rodriguez and Acosta, 1995) など報告されている。このような多岐にわたる毒性メカニズムが同時に持つ薬物において、上記の両条件で培養した細胞に対し、複合体 I の阻害が主要な毒性機序となる薬物が毒性感受性の差が見出せるが、複合体 I 阻害が主要な毒性機序ではない場合に、両条件下の細胞毒性の差を検出することが難しくなると考えられる。

Troglitazone、diclofenac、benzbromarone は典型的な薬剤性肝障害を誘発する薬物としてよく知られている。しかし、今回の評価系においては、上記の両条件で培養したラット初代培養肝細胞において、細胞毒性の増強が確認できなかった。その理由の一つとして、考えられるのは薬物に誘発したミトコンドリア障害のメカニズムでは、ATP の枯渇以外に、ミトコンドリア膜透過性遷移 (mitochondrial permeability transition, MPT)、mtDNA/ミトコンドリアタンパク質合成障害 (Pessayre *et al.*, 2012)、proteostatic stress (Wang and Chen, 2015) など報告されている。Troglitazone、diclofenac、benzbromarone の場合、この 3 薬物は MPT を強く誘発される報告されている。例えば、ラット初代肝細胞を用いた検討では、diclofenac の細胞毒性が MPT 阻害剤を加えることで、強く抑制されたことが報告され、このことから MPT が diclofenac 細胞毒性の発症に重要な役割を担っていることが明らかとなっている (Masubuchi *et al.*, 2002)。その

ため、MPT が細胞毒性の主要な毒性作用機序になる際に、例え呼吸鎖阻害や酸化ストレスなどの作用があるとしても、MPT による細胞毒性が先に引き起こし、両条件下の細胞毒性の差が見えなくなったことが推察される。以上の結果から、ミトコンドリア毒性に対する感受性が高い条件と低い条件で培養したラット初代培養肝細胞において、MPT 誘発薬物を除くミトコンドリア障害誘発薬物が検出可能となることが明らかとなった。

第4節 小括

ラット初代肝細胞は通常の培養条件下で、培養と伴って細胞の ATP 産生が徐々にミトコンドリアでの酸化的リン酸化から解糖系に移行するため、従って、ミトコンドリア毒性に対する感受性も低下した。本章ではラット初代肝細胞のミトコンドリア毒性に対する感受性を向上させることを目的とし、種々の培養条件による細胞内エネルギー代謝の変化及び細胞毒性感受性への影響について検討を行った。以下に得られた結果を要約する。

1. Galactose 培地への置換に加え、酸素濃度を 80%に上げることでより効率的に Crabtree 効果を回避できることが明らかとなった。
2. Transferrin を添加することで細胞内の貯蔵鉄が増加し、Fenton 反応で生成する ROS が薬物に起因する酸化ストレスを更に増強した。
3. 上記の培養条件と Transferrin の添加を組み合わせることで、ミトコンドリア呼吸鎖阻害活性を有する化合物を高感度に検出可能となった。

以上の結果より、これまで、がん細胞においてしか見られなかった、Galactose 培養によるミトコンドリアの活性化を、本研究において、初めてラット初代肝細胞で確認し、更に酸素供給を増強させることを加え、ミトコンドリアの活性を有意に上昇させた。また、ミトコンドリア毒性に対する感受性が高い条件と感受性が低い条件で培養したラット初代肝細胞を用いて、ミトコンドリア毒性評価系を構築し、更にミトコンドリア毒性をゆうする薬物を用いて検証し、本評価系がミトコンドリア毒性評価系としての有用性が示唆された。

第3章 ヒト肝細胞を用いたミトコンドリア毒性評価の検討

第1節 序

ラットサンドイッチ培養肝細胞は通常の肝がん由来の細胞株と比べ、胆管形成やトランスporter及び薬物代謝酵素の発現が通常培養法で培養したラット肝細胞に比べ高く、薬剤性肝毒性評価で汎用されている(Swift *et al.*, 2010; De Bruyn *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2016)。しかし、ラット初代培養肝細胞は代謝酵素や酸素要求性などの種差の観点から、ヒトへの外挿性が問題になり、特に代謝に関与するミトコンドリア毒性の評価にはヒト肝細胞を用いた検討も必要となる(Martignoni *et al.*, 2006; Wagner *et al.*, 2011)。以前の報告では、培養細胞に基づいたミトコンドリア毒性の評価が主に HepG2 などのがん細胞で行われてきた(Marroquin *et al.*, 2007)。最近、iPS 細胞(Induced Pluripotent Stem Cell)から分化したヒト心筋細胞を用いて Glucose 培地及び Galactose 培地で培養することでミトコンドリア障害に起因する心毒性の評価が可能となることも報告されている(Rana *et al.*, 2012)。しかし、これらの iPS から分化された肝細胞は、肝毒性や薬物動態の評価に必須の薬物代謝酵素やトランスporterの発現が少なく、正常肝細胞と異なったエネルギー代謝が営まれており、正常なヒト肝細胞と乖離する懸念がある。そのため、薬物肝毒性評価のゴールドスタンダードであるヒト肝細胞を用いたミトコンドリア毒性評価の検討が必要である。そこで、本章ではラットでの結果を踏まえ、ヒト凍結肝細胞を用いて、種々の培養条件下での細胞内エネルギー代謝、及びミトコンドリア毒性感受性の変化について検討した。

ヒト肝がん由来細胞株である HepaRG 細胞は主要な CYPs、Phase II 酵素、トランスporterおよび核内レセプターの発現や酵素誘導能が保持されており、初代培養肝細胞に匹敵する肝機能特性を有する。また、ヒト凍結肝細胞において問題となる細胞ロット間差が小さく、細胞入手が容易であることから創薬初期段階での肝毒性評価や CYP 誘導能評価の使用が近年増えてきた(Lubberstedt *et al.*, 2011; Pernelle *et al.*, 2011; Susukida *et al.*, 2016)。最後に、ラット初代肝細胞、ヒト凍結肝細胞、HepG2 細胞の結果を踏まえ、HepaRG 細胞を用いてミトコンドリア毒性評価における有用性について

検討した。

第2節 結果

2-1 Galactose 培地及び高濃度酸素でのヒト凍結肝細胞の培養

第2章では、ラットから単離した初代肝細胞を用いて、培地中の Glucose を Galactose に置換し、酸素需要の上昇に合わせて酸素供給量を上げることで、ミトコンドリア酸化リン酸化での ATP 産生を上昇させることに成功した。このエネルギー産生におけるミトコンドリアの寄与を上昇させることで、ミトコンドリア機能を低下させる DILI 誘発薬物による細胞毒性感受性が上昇することが明らかとなった。本章ではヒト凍結肝細胞を用いたミトコンドリア毒性評価系の構築を目的とし、まず、ヒト凍結肝細胞をラット肝細胞と同様な条件(Fig. 3-1A)でサンドイッチ培養を行い、酸素濃度と Galactose 培養の条件について検討した。その結果、酸素濃度を 80%に上げた場合に、Glucose と Galactose 培地に関わらず細胞がほぼ全滅した(unpublished data)。ヒト肝細胞の酸素要求性がラットより低いことが報告され(Wagner *et al.*, 2011)、そのためラット初代肝細胞と違って、ヒト凍結肝細胞が 80%酸素で培養した際に、酸化ストレスによる細胞死が誘発されると考えられる(Ishiguro *et al.*, 2001; Pereira *et al.*, 2012)。また、酸素濃度 20%の場合、Galactose で培養した細胞が Glucose より死んだ細胞が多く、細胞内 ATP 量も Glucose で培養した細胞の約半分程度に低下したことが明らかとなった (unpublished data)。このことから、ヒト凍結肝細胞を播種後、day2 に完全に Galactose 培地に置換することは細胞に対するストレスが大きいと考えられる。次に、ヒト凍結肝細胞において、播種した翌日に直接 100%の Galactose 培地に置換するのではなく、Glucose/Galactose それぞれ 50%の培地を用いて一日培養し、day3 から完全に Galactose 培地に置換することとした。これに加えて、また、酸素濃度 80%で培養した際に起こった細胞死とヒト肝細胞及びラット肝細胞の酸素要求性における種差を考量し(Wagner *et al.*, 2011)、酸素濃度も 80%から 40%に下げて検討を行うこととした。その結果、Galactose 培地においても細胞の形態・生存に影響を与えることなく 5 日間の培養が可能となった(Fig. 3-1B)。

2-2 ヒト凍結肝細胞を用いたミトコンドリア毒性の評価

次に、上記の条件で培養したヒト凍結肝細胞を用いて、ミトコンドリア毒性を有する薬物 rotenone、phenformin、flutamide を曝露し、細胞毒性の変化を調べた。その結果、酸素濃度 20%と 40%、何れの条件下で、Glucose 培地から Galactose 培地に置換することで rotenone、phenformin、flutamide による細胞毒性の増強が見られ、また、酸素濃度を 20%から 40%に上昇させた際には、更なる細胞毒性の増強が見られた(Fig. 3-2A, B, C)。以上の結果から、ヒト凍結肝細胞においても、ラット初代培養肝細胞と同様に、Galactose 培地及び高濃度酸素で培養することでミトコンドリア毒性に対する感受性が増強した。また、細胞毒性（生存率）の評価法として、細胞から漏出する LDH の活性を測定する以外に、生細胞のみが持つ ATP を定量することで生存率を求める方法も汎用されている。次に、上記の LDH assay で使用された細胞内の ATP 量を測定したところ、その結果 LDH assay の結果と同様な傾向が見られた(Fig. 3-2D, E, F)。

2-3 Galactose 培養及び高濃度酸素による乳酸産生量への影響

以上の結果から、ヒト凍結肝細胞においても、Galactose 培地及び高濃度酸素で培養することでミトコンドリア毒性に対する感受性が増強したことが明らかとなった(Fig. 3-2)。その際に、細胞内のエネルギー代謝がどのように変化するかを調べるために、嫌気呼吸活性の指標である乳酸産生量の変化を測定した。同時に、ラットから単離した初代肝細胞を Fig. 3-1A で述べたタイムコースで酸素濃度 20%と 40%で細胞を培養し、ヒト凍結肝細胞の乳酸産生量の経日変化と比較した。その結果、ラット初代肝細胞においては、Galactose 培地への置換と酸素濃度 40%での培養によって、乳酸産生量が有意に低下したことが明らかとなった(Fig. 3-3B)。一方、ヒト凍結肝細胞では、予想に反して、酸素濃度 20%/40%、及び Glucose/Galactose 何れの培養条件下で乳酸産生量の変化が認められなかった(Fig. 3-3A)。また、種々の条件下で培養したヒト凍結肝細胞は培養の日数に伴い、乳酸産生量が増加したことが明らかとなった(Fig. 3-3A)。

2-4 Galactose 培養による HepaRG 細胞の毒性感受性の増強

ヒト肝腫瘍由来細胞株である HepaRG 細胞は主要な CYP やトランスポーターの発現や酵素誘導能が保持されており、ヒト凍結肝細胞の代替として、最後に HepaRG 細胞を用いて、ミトコンドリア毒性評価における有用性について検討した。培養条件を検討した結果、酸素濃度を 20%と 40%に設定し、また、day1 に Glucose 含有の専用培地 HepaRG Thaw, Seed and General Purpose Medium 670 (Biopredic International, Rennes, France)で 24 時間培養した後に、day2 から完全に Galactose 培地に置換しても細胞生存に影響しないため、以降の検討で酸素濃度を 20%と 40%、Galactose 培地を day2 に置換することとした(Fig. 3-1C)。

次に、酸素濃度を 20%・40%、Glucose 培地・Galactose 培地、種々の条件下で 7 日間培養した HepaRG 細胞に rotenone、phenformin、flutamide を曝露し、HepaRG 細胞のミトコンドリア毒性に対する感受性の変化を調べた。その結果、rotenone、phenformin について、Galactose 培養によって、細胞毒性が大幅に増強し(Fig. 3-4A, B)、flutamide もある程度の毒性増強が見えた(Fig. 3-4C)。しかし、ラット初代培養肝細胞やヒト凍結肝細胞と異なり、酸素濃度 20%から 40%に上げた際に、毒性の増強が確認できなかった(Fig. 3-4)。以上の結果から、HepaRG 細胞は Galactose 培養によって、ミトコンドリア毒性に対する感受性が大幅に増強する、一方で、初代肝細胞で見られた高濃度酸素培養による細胞毒性の増強への影響は HepaRG 細胞では見られなかった(Fig. 2-5, Fig. 3-4)。そこで、この初代肝細胞と異なった感受性の変化を解明するために、Galactose 培地及び高濃度酸素で培養した際に、HepaRG 細胞内エネルギー代謝の変化を調べた。

2-5 Galactose 培養による HepaRG 細胞内エネルギー代謝への影響

分化した HepaRG 細胞は播種後、day2 から酸素濃度を 20%・40%、Glucose 培地・Galactose 培地、種々の条件下で培養し、培地交換が二日ごとに行い、day6 から day7 までの 48 時間以内の乳酸産生量を調べたところ、予想に反して、Galactose 培地で培養した細胞が Glucose 培地で培養した細胞と比べ、乳酸産生量の低下が見えなかった

(Fig. 3-5A)。また、酸素濃度 40%で培養した細胞においても、酸素濃度 20%で培養した細胞と比べ、乳酸産生量の低下が見えなかった(Fig. 3-5)。一方、HepG2 細胞を用いた検討では、HepaRG 細胞と同様に種々の条件下で培養し、48 時間以内の乳酸産生量を調べたところ、HepG2 細胞においては Galactose 培養により、乳酸産生量が著しく低下した。また、酸素濃度 40%での培養が乳酸産生量に影響しないことが観察された(Fig. 3-5B)。

また、Galactose 培地による細胞内解糖系への影響を調べるために、解糖系関連酵素 PK(Pyruvate kinase)の mRNA 発現変動を測定した。その結果、HepG2 細胞では Galactose 培養により、PK の mRNA 発現が有意に低下し、また、酸素濃度 40%での培養が PK の発現に影響しないことが明らかとなった(Fig. 3-6E)。HepG2 細胞では PK の発現変動が乳酸産生量の変化と同様な傾向を示した(Fig. 3-5B, Fig. 3-6E)。一方、HepaRG 細胞においては、PK の発現変化が乳酸産生量と同様に、Galactose 培養及び高濃度酸素での培養による PK の発現変化が見えなかった(Fig. 3-5A, Fig. 3-6A, B)。このことが更に Galactose 培地及び高濃度酸素での培養が HepaRG 細胞内の解糖系の活性に影響しないことが明らかとなった。

Galactose 培地が細胞内の抗酸化機能に影響することが報告されている(Lane *et al.*, 2015)。次に、Galactose 培養による HepaRG 細胞におけるミトコンドリア毒性に対する感受性の増強のメカニズムを調べるために、細胞内の主要な抗酸化剤でありグルタチオン量、及び抗酸化作用に関わる SOD2 (Superoxide dismutase 2) の mRNA 発現と rotenone 存在下の ROS 産生量を調べた。その結果、HepaRG 細胞が酸素濃度を 20%・40%及び Glucose 培地・Galactose 培地の種々の条件下で培養した、day4 と day7 において SOD2 の mRNA 発現を調べたところ、Galactose 培養により SOD2 の mRNA 発現が低下し、酸素濃度 40%で培養することで SOD2 の発現が更に低下したことが観察された (Fig. 3-6C, D)。また、上記の各条件で七日間培養した HepaRG 細胞において、day7 の細胞内グルタチオン量を調べたところ、Galactose 培地で培養した細胞が Glucose 培地で培養した細胞と比べ、有意に低下した(Fig. 3-7A)。一方、HepG2 細胞においては、この Galactose 培養によるグルタチオン量の低下が見えなかった(Fig. 3-7B)。各条件で七日間培養した HepaRG 細胞に電子伝達系酵素複合体 I の阻害剤 rotenone を曝露し、ROS 産生量を調べたところ、Glucose 培地で培養した細胞と比べ、Galactose

培養により、ROS 産生量の増加が観察された(Fig. 3-8)。ラット初代培養肝細胞では Galactose 培地及び高濃度酸素で培養した際に、ミトコンドリアが活性化され、従って、rotenone 存在下の ROS 産生量が増加した(Fig. 2-6)。HepaRG 細胞においても、Galactose 培地で培養した際に ROS 産生量の増加が見えたことから、HepaRG 細胞においても、Galactose 培地で培養した際に、ミトコンドリア機能の活性化は起こっていることが推察されました(Fig. 3-8)。

2-6 HepaRG 細胞を用いたミトコンドリア毒性の評価

上記の検討で Galactose 培養が HepaRG 細胞のミトコンドリア毒性に対する感受性を著しく増強させたため、本項目で、酸素濃度 20%で、Glucose 培地または Galactose 培地で培養した細胞を用いて、ラット初代肝細胞と同様な手法を用いてミトコンドリア毒性を有する 11 化合物を二条件下での TC_{50} とその比を算出し、ミトコンドリアの毒性評価を行った。その結果、電子伝達系酵素複合体 I の阻害活性を持つ薬物の中で、rotenone、flutamide、ketoconazole、phenformin は Galactose 培養によって、細胞毒性の増強が見られ、一方、ラット初代肝細胞で見られた amiodarone、metformin 細胞毒性の増強が HepaRG 細胞においては見えなかった(Fig. 3-9A-F, Table 3-1)。酸化ストレスを誘発する薬物 amitriptyline、imipramine も細胞毒性の増強が確認できなかった(Fig. 3-9G, H, Table 3-1)。一方、ラット初代肝細胞で毒性の増強が見られなかった MPT 誘発する薬物、troglitazone、benzbromarone が HepaRG 細胞において細胞毒性の増強が確認し、diclofenac は毒性増強が確認できなかった(Fig. 3-9I, J, K, Table 3-1)。

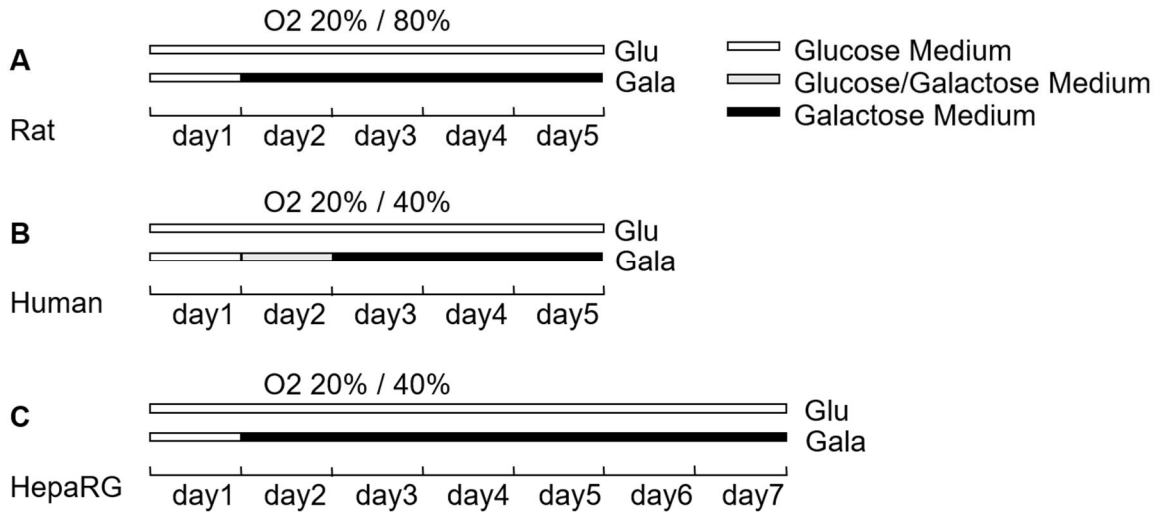


Fig. 3-1. Time course used in primary rat hepatocytes, cryopreserved human hepatocytes and HepaRG cells culture for mitochondrial toxicity assessment. Primary rat hepatocytes were cultured in glucose medium, 20% or 80% oxygen for the first 24 h. From day2, cells were cultured in glucose or galactose medium and 20% or 80% oxygen for 5 days (A). For cryopreserved human hepatocytes, thawed cells were cultured in glucose medium, 20% oxygen for the first 24 h. On day2, oxygen concentration was set to 20 and 40%, glucose medium was substituted to glucose/galactose (50%/50%) for adaption, and then medium was further changed to 100% galactose medium and cultured for other 3 days. Control cells were cultured by glucose medium throughout the culture (B). For HepaRG cells, thawed cells were cultured in glucose medium, 20% oxygen for the first 24 h. From day2, cells were cultured in glucose or galactose medium and 20% or 40% oxygen for 7 days (C).

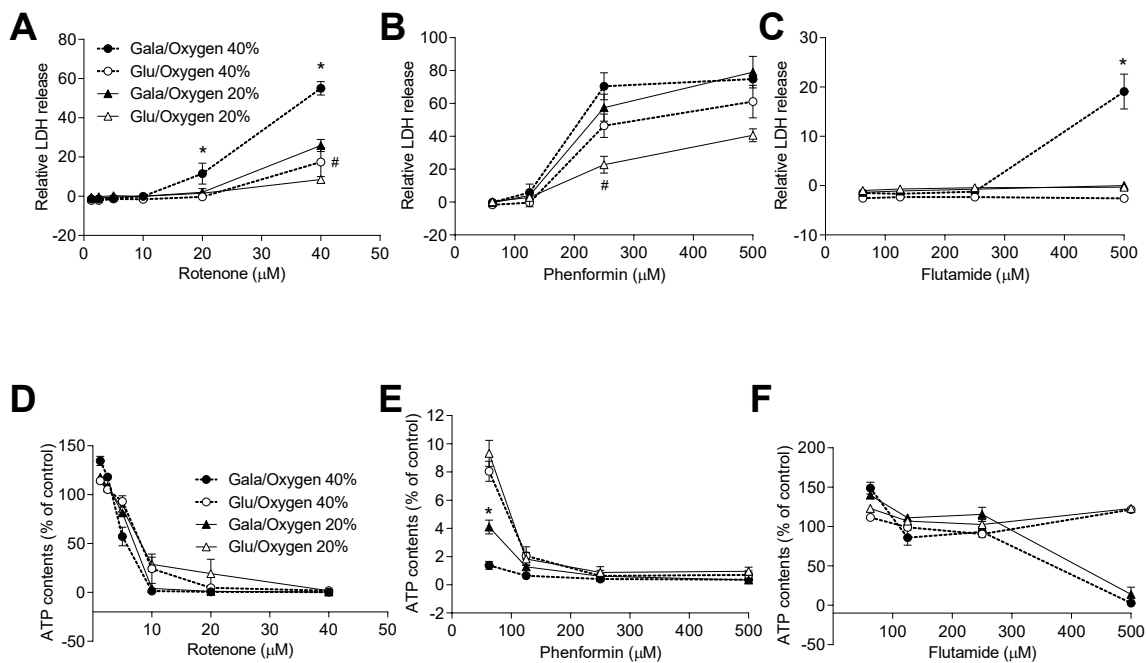


Fig. 3-2. Effect of hyperoxia and altered glycolysis substrate on the sensitivity of cryopreserved human hepatocytes to mitochondrial toxicants. Cells were cultured as mentioned in Fig. 3-1B in 20% or 40% oxygen. Mitochondrial toxicants rotenone, phenformin and flutamide were added to cells cultured in each condition

for the last 24 h, then LDH release and cellular ATP contents was measured. Data are means \pm SD, n=3. * $p < 0.05$, Gala/Oxygen 20% vs. Gala/Oxygen 40% (filled symbol); # $p < 0.05$ Glu/Oxygen 20% vs. Glu/Oxygen 40% (open symbol). Statistical analysis was performed using ANOVA followed by LSD test.

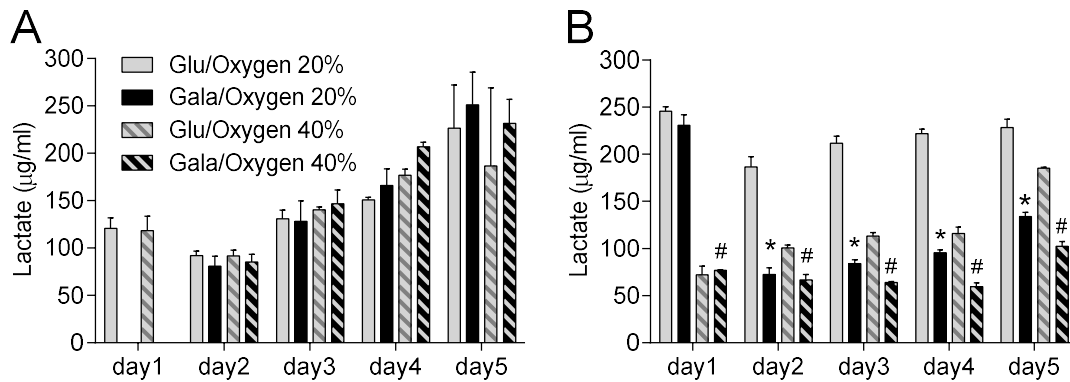


Fig. 3-3. Effect of substituting medium Glucose with Galactose in hyperoxia on extracellular lactate release. Cryopreserved human hepatocytes (A) and primary rat hepatocytes (B) were cultured as mentioned in Fig. 3-1A and B in 20% or 40% oxygen. Glucose and Galactose media were changed every day, and the lactate released into the medium within 24 h was measured. Data are mean \pm SD, n=3, * $p < 0.05$ Glucose/20% oxygen vs. Galactose/20% oxygen on each day; # $p < 0.05$ vs. Galactose/20% oxygen vs. Galactose/80% oxygen on each day. Statistical analysis was performed using ANOVA followed by LSD test.

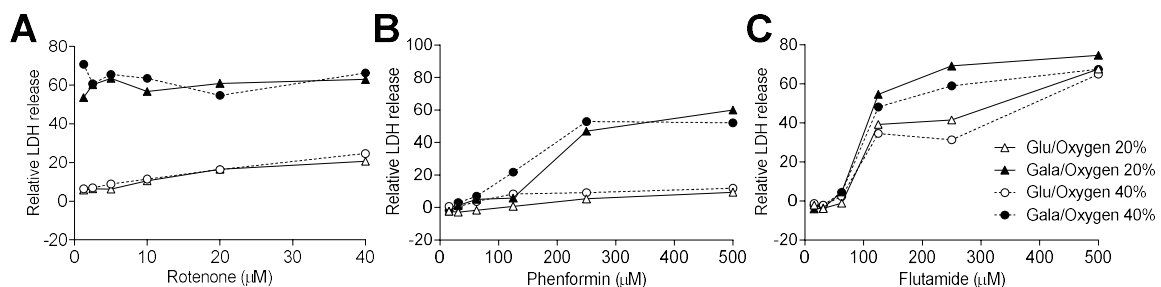


Fig. 3-4. Effect of hyperoxia and altered glycolysis substrate on the sensitivity of HepaRG cells to mitochondrial toxicants. Cells were cultured as mentioned in Fig. 3-1C in 20% or 40% oxygen. Mitochondrial toxicants rotenone, phenformin and flutamide were added to cells cultured in each condition for the last 24 h and the LDH release was measured using Triton X-100-treated cells as a control for maximum release (high control). n=1.

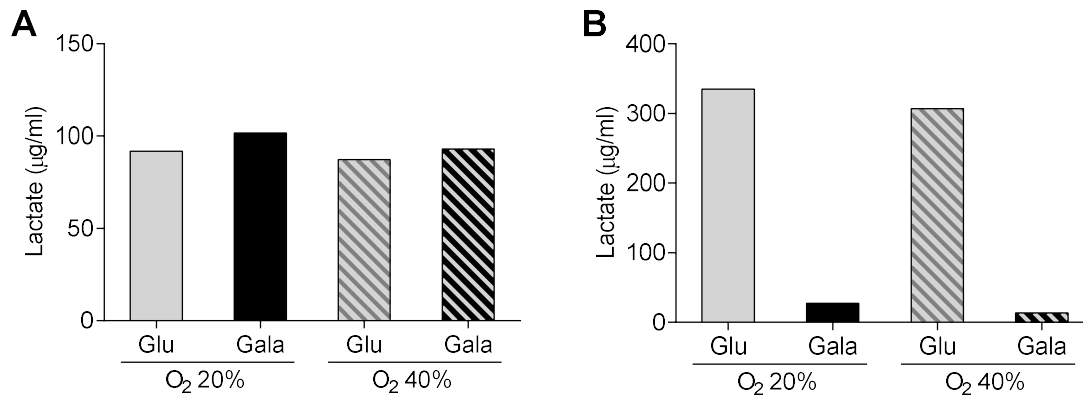


Fig. 3-5. Effect of substituting medium Glucose with Galactose in hyperoxia on extracellular lactate release. HepaRG cells (A) and HepG2 (B). cells were cultured as mentioned in Fig. 3-1C in 20% or 40% oxygen. Glucose and Galactose media were changed every 2 days, and the lactate released into the medium within 48 h was measured. n=1.

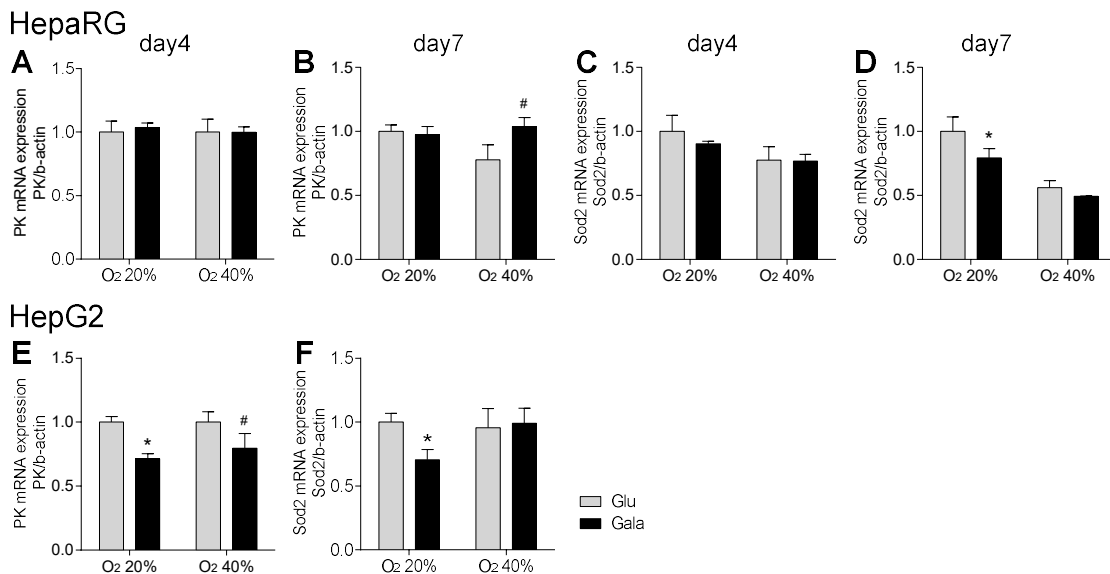


Fig. 3-6. Effect of hyperoxia and altered glycolysis substrate on the mRNA expression of PK (Pyruvate kinase) and SOD2 (Superoxide dismutase 2) in HepaRG cells (A-D) and HepG2 cells (E, F). HepaRG cells and HepG2 were cultured as mentioned in Fig. 3-1 in 20% or 40% oxygen. Glucose and Galactose media were changed every 2 days. For HepaRG cells, mRNA sample from cells cultured in each condition were collected on day 4 and 7. For HepG2 cells, mRNA sample were extracted from cells cultured in each condition for 7 days. Data are mean \pm SD, n=3, * $p < 0.05$ Glucose/20% oxygen vs. Galactose/20% oxygen on each day; # $p < 0.05$ vs. Glucose/40% oxygen vs. Galactose/40% oxygen on each day. Statistical analysis was performed using ANOVA followed by LSD test.

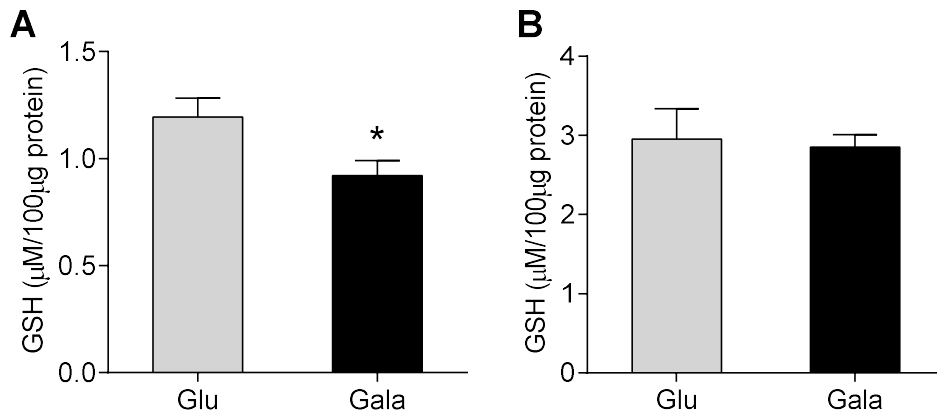


Fig. 3-7. Effect of substituting medium Glucose with Galactose on cellular glutathione contents of HepaRG cells (A) and HepG2 cells (B) in 20% oxygen. Primary rat hepatocytes were cultured as mentioned in Fig. 3-1 in 20% oxygen. Glucose and galactose media were changed every 2 days for 7 days, then cellular glutathione contents was measured. Data are means \pm SD, n=3, * p<0.05 vs. glucose. Statistical analysis was performed using Student t-test.

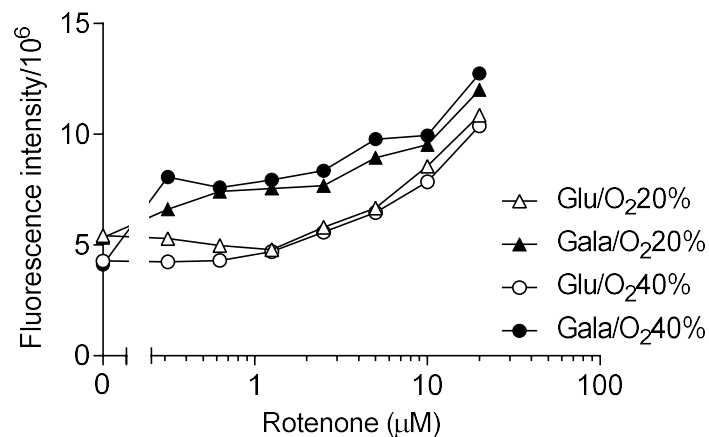


Fig. 3-8. Effect of substituting medium Glucose with Galactose in hyperoxia on ROS generation of HepaRG cells. HepaRG cells were cultured as mentioned in Fig. 3-1C in 20% or 40% oxygen. Glucose and Galactose media were changed every 2 days for 7 days. On day 7, cells cultured in each condition were treated with rotenone for 12 h and the ROS generation were measured. n=1.

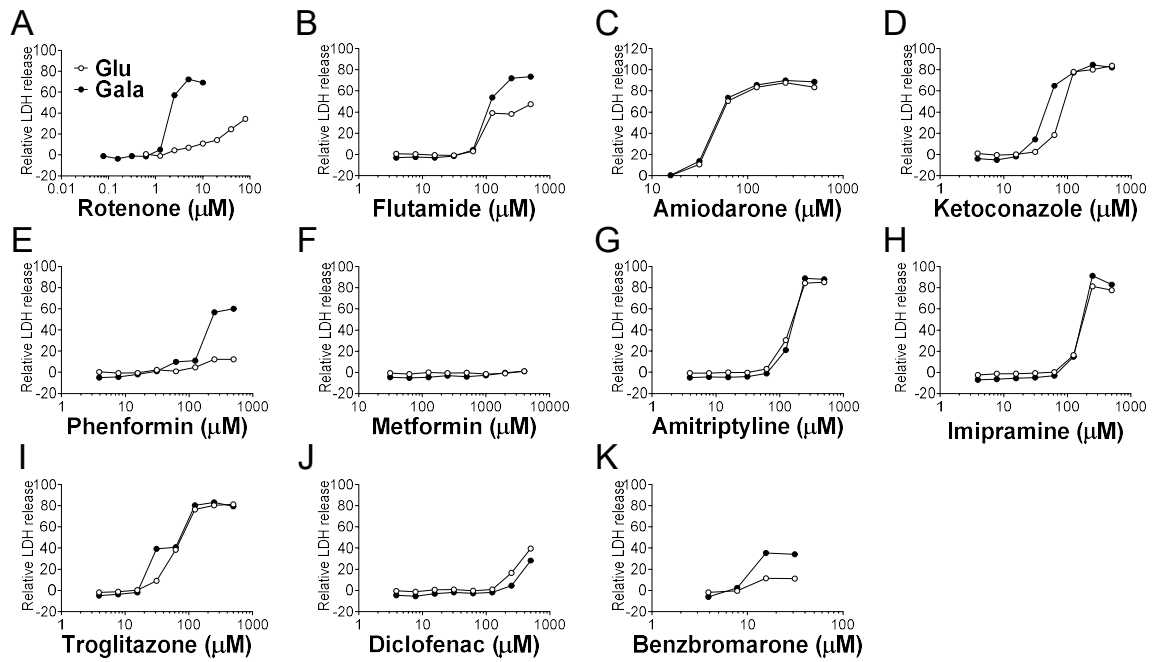


Fig. 3-9. Dose-responses for HepaRG cells cultured in Glucose/20% oxygen (open symbol) or galactose/40% oxygen (filled symbol) treated with several drugs that could impair mitochondrial function. Cells were cultured as mentioned in Fig. 3-1C in 20% or 40% oxygen and treated with drugs for the last 24 h. LDH release was measured using Triton X-100-treated cells as a control for maximum release (high control). n=1.

Table 3-1. TC₅₀ values (μM) of test compounds in rat primary hepatocytes cultured in Glucose/20% oxygen without transferrin or galactose/80% oxygen with transferrin, and in HepaRG cells cultured in Glucose/20% oxygen or galactose/40% oxygen.

	HepaRG Cells			Rat Hepatocytes		
	TC _{50,Glu}	TC _{50,Gala}	TC _{50,Glu} / TC _{50,Gala}	TC _{50,Glu}	TC _{50,Gala}	TC _{50,Glu} / TC _{50,Gala}
Amiodarone	45.6	43.7	1.04	>500	121	>4.13
Rotenone	>80.0	1.91	>42.0	1.51	<0.5	>3.02
Phenformin	>500	161	>3.10	267	<150	>1.78
Flutamide	96.5	100	0.96	85.3	52.2	1.63
Ketoconazole	77.4	43.8	1.77	54.3	45.3	1.20
Metformin	>500	>500	1.00	>500	>500	1.00
Amitriptyline	138	132	1.05	176	96.6	1.82
Imipramine	132	132	1.00	215	129	1.67
Troglitazone	63.2	41.8	1.51	64.1	63.0	1.02
Benzbromarone*	14.3	9.16	1.56	10.2	10.3	0.99
Diclofenac	>500	>500	1.00	324	326	0.99

Test compounds were ranked by the order of TC_{50,Glu}/ TC_{50,Gala} which was calculated as an index of the potency of mitochondrial toxicity. TC₅₀ values were calculated using four-parameter method (Graph Pad Software, San Diego, CA) or approximately estimated using the formula: $TC_{50} = 10^{(\text{Log}(A/B) \times (50-C)/(D-C) + \text{Log}(B))}$ (A: Corresponding concentrations of test compound directly above 50% inhibition; B: Corresponding concentrations of test compound directly below 50% inhibition; C: % inhibition directly below 50% inhibition; D: % inhibition directly above 50% inhibition)(Arita-Moriok *et al.*, 2015).

* TC_{50,Glu}/ TC_{50,Gala} of Benzbromarone was calculated by TC₁₀.

第3節 考察

3-1 ヒト凍結肝細胞を用いたミトコンドリア毒性評価の検討

創薬において早期から潜在的な肝障害リスクを予測することが重要である。この創薬早期段階での肝毒性評価には、スループットの良さと種差を考慮して、HepG2 やヒト凍結初代肝細胞などヒト肝細胞を用いた *In vitro* 評価系が多く用いられている (Godoy *et al.*, 2013)。しかし、通常培養条件下で、初代肝細胞のミトコンドリア毒性に対する感受性が低下したため、代謝機能を持つヒト肝細胞 (ヒト凍結肝細胞、HepaRG 細胞等) を用いた適切なミトコンドリア毒性評価系がまだ報告されていない。本章では、ラット初代培養肝細胞を用いたミトコンドリア毒性評価の結果を踏まえて、種々の培養条件下で培養したヒト肝細胞の細胞内エネルギー代謝、及びミトコンドリア毒性に対する感受性の変化について検討を行った。ミトコンドリア毒性を評価した結果、ラット初代培養肝細胞と同様に、ヒト凍結肝細胞が Glucose 培地から Galactose 培地への置換、または酸素濃度を 20% から 40% に上昇した際に、電子伝達系酵素複合体 I の阻害活性を持つ薬物 rotenone、phenformin、flutamide の細胞毒性が増強することが確認された (Fig. 3-2)。しかし、ラット初代培養肝細胞を用いたミトコンドリア毒性評価の結果と比べ、ヒト凍結肝細胞での細胞毒性が全体的に弱い傾向が見られた (Fig. 2-5, Fig. 2-7, Fig. 3-2)。このことから、通常の Glucose 培養の条件下で、ヒト凍結肝細胞と比べ、ラット初代培養肝細胞のエネルギー代謝がより好気呼吸に偏ったと推察された。

また、嫌気呼吸の指標である乳酸産生量を調べたところ、予想に反して、Galactose 培地及び高濃度酸素での培養による乳酸産生量の低下が確認できなかった (Fig. 3-3A)。ヒト凍結肝細胞において、乳酸産生量が低下しなかった原因として、凍結によるミトコンドリア機能の低下やドナーの年齢による影響などが考えられる (Marchesini *et al.*, 1988)。単離したヒトまたはマウスの肝細胞は凍結保存した後に、ミトコンドリア膜電位の低下、細胞内 ATP 量、呼吸鎖複合体活性の低下、ミトコンドリアの形態変化などが観察されたことが報告されている (Stephene *et al.*, 2007)。そのため、新鮮な初代肝細胞で見られた Galactose 培養や高濃度酸素培養による酸化的リン酸化の活性化は、凍結肝細胞では、ミトコンドリアが凍結による障害を受けたため、Galactose 培地に置

換した際に、Galactose から解糖系を経て生じたピルビン酸がミトコンドリアでの酸化リン酸化に消費された量が新鮮な肝細胞より少ないことが考えられる。その結果、galactose から生成されたピルビン酸の大部分が乳酸に変え、或いは糖新生を経て Glucose になることが考えられる(Lubberstedt *et al.*, 2011)。Day5 の乳酸産生量の結果では、酸素濃度 20%、40%いずれの条件下で、galactose で培養した際に Glucose 培養より乳酸産生量が増加した傾向が見えたことから、galactose からピルビン酸が最終的に乳酸になり、また、galactose の解糖系における ATP の産生効率が Glucose より低いため、より多くの galactose が消費され、より多くの乳酸が生成されたと考えられる(Fig. 3-3A)。今後、この問題点を解決するためには、非凍結ヒト初代肝細胞やヒト肝細胞キメラマウスから単離した肝細胞などの方法が考えられ、それらの検討の進みと伴い、ミトコンドリアの毒性評価に応用することは期待できる(McGinnity *et al.*, 2004; Kamimura and Ito, 2016)。

3-2 HepaRG 細胞を用いたミトコンドリア毒性評価の検討

HepaRG 細胞は主要な CYP やトランスポーターの発現や酵素誘導能が保持されていることが知られており、最後にヒト凍結肝細胞の代替として、HepaRG 細胞を用いてミトコンドリア毒性評価における有用性について検討した。酸素濃度 20%・40%、Glucose 培地・galactose 培地、種々の条件下で培養した HepaRG 細胞にミトコンドリア毒性を有する薬物、rotenone、phenformin を曝露し、細胞毒性を調べたところ、酸素濃度 20%・40%いずれの条件下で、Glucose 培地から galactose 培地に置換することで、rotenone と phenformin の細胞毒性が有意に上昇した(Fig. 3-4A, B)。一方で、酸素濃度 20%から 40%に上げた際にラット初代培養肝細胞とヒト凍結肝細胞で見られた細胞毒性の増強が HepaRG 細胞においては見えなかった(Fig. 3-4A, B)。また、乳酸産生量を調べたところ、HepaRG 細胞はヒト凍結肝細胞と同様に、galactose 培養による乳酸産生量の低下が見えなかったことから、galactose 培養は HepaRG 細胞とヒト凍結肝細胞の嫌気呼吸を抑制できなかったことが明らかとなった(Fig. 3-3, Fig. 3-5)。しかし、rotenone と phenformin の細胞毒性が増強したことから、ミトコンドリアの活性化或いは ROS 産生の増加が起きていると推察された。種々の条件下で培養した HepaRG 細

胞に rotenone を曝露し、ROS 産生量を調べたところ、galactose 培養による ROS 産生量が増加し、酸素濃度 40%に上げた際に ROS 産生量が増加しないことが明らかとなった(Fig. 3-8)。ROS 産生量の結果は、細胞毒性と一致したため、HepaRG 細胞における galactose 培養による細胞毒性の増強が ROS 産生量の増加によるもの、また、ROS 産生量が増加したことから galactose 培地で培養した際に、ミトコンドリア機能の活性化は起こっていると推察された。

HepaRG 細胞を用いたミトコンドリア毒性の評価では、ミトコンドリア電子伝達系酵素複合体 I の阻害活性を持つ薬物の中で、Rotenone、Phenformin、Ketoconazole、Metformin は相対的に高い TC₅₀ の比が算出され(Fig. 3-8A, D, E, F)、ラット初代培養肝細胞と同様な結果が得られた。一方、Amiodarone、Flutamide と酸化ストレス誘発する薬物 Amitriptyline と Imipramine は HepaRG 細胞では Galactose 培養による毒性の増強が見えなかった(Fig. 3-8B, C, G, H)。ラット初代培養肝細胞において、Galactose 培養するだけで細胞毒性が増強しなかったため、酸素濃度 80%での培養と transferrin の添加が毒性感受性の増強に対し重要であることが考えられる(Fig. 2-7)。また、ラット初代培養肝細胞で見られなかった MPT 誘発薬物 Troglitazone、Benzbromarone の細胞毒性の増強は HepaRG 細胞を用いた評価では、細胞毒性の増強が見られた。このことから、HepaRG 細胞とラット初代培養肝細胞は MPT に対して異なる感受性を持つことが示唆された。

HepaRG 細胞とラット初代培養肝細胞を用いたミトコンドリア毒性評価の結果を合わせて見ると、ミトコンドリア電子伝達系酵素複合体 I の阻害活性を持つ薬物と MPT 誘発薬物に対し、HepaRG 細胞で構築した評価系がラット初代培養肝細胞より高い感受性を示した。特に電子伝達系酵素複合体 I 阻害剤 rotenone に対して、HepaRG 細胞において、両条件下の TC₅₀ 比が 40 以上の値が算出され、十分な検出感度を示した。また、ビグアナイド系の抗糖尿病薬である phenformin と metformin においても、HepaRG 細胞で評価した結果は臨床上肝毒性リスクの順番と一致したことが明らかとなった。Amitriptyline などの酸化ストレス誘発する薬物は HepaRG 細胞を用いた評価では、ミトコンドリア毒性が検出されなかったが、ラット初代培養肝細胞においても、Galactose 培地で培養することだけで細胞毒性が増強しないため、高濃度酸素での培養と transferrin の添加を加えれば、細胞毒性の増強が期待できると考えられる。以上の

結果から、ミトコンドリア毒性に対する感受性が高い条件と低い条件で培養した HepaRG 細胞がスクリーニング系としての有用性が示唆された。

第4節 小括

ラット初代培養肝細胞は Galactose 培地への置換に加え、酸素濃度を 80%に上げることでミトコンドリアでの酸化的リン酸化が活性化され、従って、ミトコンドリア毒性に対する感受性も増強した。本章では、ヒト凍結肝細胞と HepaRG 細胞を用いて、ラット初代培養肝細胞と同様な手法が適用できるかについて検討した。以下に得られた結果を要約する。

1. ヒト凍結肝細胞では Galactose 培地及び高濃度酸素で培養することによるミトコンドリア毒性薬物の毒性増強は限定的であり、乳酸産生量の低下も認められなかった。
2. HepaRG 細胞では Galactose 及び高濃度酸素で培養することでミトコンドリア毒性感受性が増強した。この増強はミトコンドリア機能活性化に伴う ROS 産生増加に起因するものと推察された。
3. HepaRG 細胞を適切な条件で培養することにより、ミトコンドリア障害に起因する肝毒性薬物スクリーニングに利用できることが示唆された。

以上の結果より、ヒト凍結肝細胞では Galactose 培地及び高濃度酸素で培養することによるミトコンドリア毒性薬物の毒性増強は限定的であり、乳酸産生量の低下も認められず、Crabtree 効果を回避する培養条件を見出すには至らなかった。一方、HepaRG 細胞は Galactose 培地で培養することによるミトコンドリア毒性薬物の毒性が強く増強し、また、薬物代謝能、種差、利便性などの観点からもミトコンドリア毒性に起因する肝毒性薬物スクリーニング系としての有用性が示唆された。

第4章 総括

薬剤性肝障害は医薬品が上市され、患者に使用されて初めて発現する重篤な副作用であり、医薬品の開発及び安全服用を考える上で重要な問題になる。そのため、早期から潜在的な肝障害リスクを予測することが創薬において重要になっている。薬物によるミトコンドリア毒性は薬剤性肝障害の発症メカニズムの一つとして近年報告され、単離ミトコンドリアを用いた毒性評価に関する研究も多くされている。本研究では、今までの評価系で評価するのが困難であり、薬物代謝に関与するミトコンドリア毒性評価系の構築を目的とし、ラット初代培養肝細胞、ヒト凍結肝細胞及び HepaRG 細胞を用いて、種々の培養条件下において、細胞内エネルギー代謝の変化、ミトコンドリア毒性化合物に対する感受性の変化について検討した。

第2章 ラット初代肝細胞を用いたミトコンドリア毒性の評価

ラット初代肝細胞は通常の培養条件下で、培養と伴って細胞の ATP 産生が徐々にミトコンドリアでの酸化的リン酸化から解糖系に移行するため、従って、ミトコンドリア毒性に対する感受性も低下したことが知られている(Fu *et al.*, 2013)。第2章ではラット初代培養肝細胞のミトコンドリア毒性に対する感受性を向上させることを目的とし、種々の培養条件による細胞内エネルギー代謝の変化及び細胞毒感受性への影響について検討を行った。その結果、Galactose 培地への置換に加え、酸素濃度を80%に上げることでより効率的に Crabtree 効果を回避できることが明らかとなった。また、Transferrin を添加することで細胞内の貯蔵鉄が増加し、Fenton 反応で生じた ROS が薬物に起因する酸化ストレスを更に増強させた。以上の培養条件と Transferrin の添加を組み合わせることで、ミトコンドリア呼吸鎖複合体の阻害活性を有する化合物を高感度に検出可能となった。以上の結果より、Galactose 培養によるミトコンドリアの活性化が、ラット初代肝細胞で確認し、酸素供給を増強させることを加え、更にミトコンドリアでの酸化的リン酸化を活性させた。また、ミトコンドリア毒性に対する感

受性が高い条件と感受性が低い条件で培養したラット初代肝細胞を用いて、ミトコンドリア毒性評価系を構築し、更にミトコンドリア毒性を有する薬物を用いて検証した結果、本評価系がミトコンドリア障害に起因する肝毒性評価系としての有用性が示唆された。

第3章 ヒト肝細胞を用いたミトコンドリア毒性評価の検討

ラット初代肝細胞は代謝酵素や酸素要求性などの種差の観点から、ヒトへの外挿性が問題になり、ヒト由来の肝細胞を用いた検討が必要になった。第3章ではヒト凍結肝細胞と HepaRG 細胞を用いて、ラット初代培養肝細胞と同様な手法が適用できるかについて検討した。その結果、ヒト凍結肝細胞では Galactose 培地及び高濃度酸素で培養することによるミトコンドリア毒性薬物の毒性増強は限定的であり、乳酸産生量の低下も認めらず、ヒト凍結肝細胞では Crabtree 効果を回避する培養条件を見出すには至らなかった。HepaRG 細胞では Galactose 及び高濃度酸素で培養することでミトコンドリア毒性感受性が増強した。この増強はミトコンドリア機能活性化に伴う ROS 産生増加に起因するものと推察された。HepaRG 細胞を適切な条件で培養することにより、ミトコンドリア障害に起因する肝毒性薬物スクリーニングに利用できることが明らかとなった。

肝臓は他の臓器と比べ酸素要求性の高い臓器であることが知られている。そのため、薬物によるミトコンドリア障害性とその先の肝細胞毒性を正しく評価するには、培養肝細胞を用いてミトコンドリア毒性を評価する際には、用いる細胞の性質に応じた適切な培地条件、酸素濃度の設定が重要であることが示された。本研究ではラット初代肝細胞及び HepaRG 細胞に対し、それぞれのミトコンドリア毒性感受性を増強させる培養条件を見出し、ミトコンドリア障害に起因する肝毒性評価に貢献しうると考えられる。

第5章 実験の部

第1節 実験動物

Sprague-Dawley 系雄性ラット (7-8 週齢) を日本エスエルシー (株) より購入した。ラットはオリエンタル酵母 (株) より購入した実験用動物飼料を与え、水や飼料は自由に摂食させた。購入したラットは温度コントロールの環境下にて 12 時間明暗サイクルで飼育し、購入後最低限一日以上飼育し、体重が 200-300g のものを実験に使用した。

第2節 試薬

本研究で用いた主な試薬を以下に示す。塩類などの一般的な試薬はここでは記載しない。また、下記記載及びその他の試薬はすべて特級或いは生化学用、細胞培養用試薬を用いた。

Williams' medium E	Life Technologies (Grand Island, NY, USA)
Fetal bovine serum (FBS)	Life Technologies (Grand Island, NY, USA)
Antibiotic-antimycotic solution	Life Technologies (Grand Island, NY, USA)
ITS ⁺ Premix	Corning (Bedford, MA, USA)
Matrigel	Corning (Bedford, MA, USA)
Glucose-free Williams' medium E	Cells Science & Technology (Sendai, Japan)
Collagenase	Wako (Osaka, Japan)
Insulin	Wako (Osaka, Japan)
Dexamethasone	Wako (Osaka, Japan)
Lactate dehydrogenase	Wako (Osaka, Japan)
Glutamate Pyruvate Transaminase (porcine)	Roche Applied Science (IN, USA)
Transferrin (human)	Nacalai Tesque (Kyoto, Japan)
2,7-dichlorodihydrofluorescein	Cayman Chemical (MI, USA)

diacetate (DCFH-DA)	
NADPH	
NAD ⁺	
Galactose	Wako Ltd. (Osaka, Japan)
Rotenone	Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA),
Flutamide	Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA),
Amiodarone	Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA),
Ketoconazole	LKT laboratories, Inc. (St. Paul, MN, USA).
Phenformin	Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA),
Metformin	LKT laboratories, Inc. (St. Paul, MN, USA).
Antimycin	Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA),
Oligomycin	Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA),
Amitriptyline	LKT laboratories, Inc. (St. Paul, MN, USA).
Imipramine	Wako Ltd. (Osaka, Japan)
Nortriptyline	LKT laboratories, Inc. (St. Paul, MN, USA).
Troglitazone	Wako Ltd. (Osaka, Japan)
Diclofenac	Wako Ltd. (Osaka, Japan)
Benzbromarone	Wako Ltd. (Osaka, Japan)
Tripan blue	Life Technologies, Grand Island, NY
DMEM medium	Life Technologies, Grand Island, NY

第3節 統計解析

実験データは平均値±標準偏差で示した。有意差検定は2群検定については Two-tailed Student's *t*-test、多群間検定の場合は分散分析として Dunnett's test、もしくは LSD test 法をもちいた(GraphPad Software, San Diego, CA)。有意水準を 0.05 とし、P 値 < 0.05 を有意差ありと判断した。

第4節 実験方法

4.1 ラット初代肝細胞の単離

Sprague-Dawley 系雄性ラット (7-8 週齢)をペントバルビタール(64.8mg/kg body weight, i.p)にて麻酔後、Ogimura らの方法を一部改変し、二段階灌流法にて初代培養肝細胞を単離した(Ogimura *et al.*, 2011)。まず、ラット門脈より Perfusion buffer を灌流後、Collagenase buffer を灌流した。その後、120 mesh、200 mesh の順で遊離した細胞をろ過後、700rpm にて 3min、4°C 遠心、上清を捨て、24mL WME, 21.6mL Percoll, 2.4mL 10×HBSS (Ca²⁺ free)で再懸濁、転倒混和。700rpm にて 15min、4°C 遠心した。得られたペレットを All free WME で再懸濁、200mesh でろ過後、700rpm にて 3min、4°C 遠心を行った。肝細胞の viability は tripan blue exclusion 法にて求めた。全ての検討において viability > 85%のものを用いた。なお、肝細胞単離は全て無菌条件下で実験を行った。

10×HBSS (Ca²⁺ free)

NaCl	40 g
KCl	2 g
KH ₂ PO ₄	0.6 g
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	0.386 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1 g
NaHCO ₃	1.75 g
MilliQ	up to 500 mL

10× perfusion buffer

KCl	4.0 g
KH ₂ PO ₄	0.6 g
NaCl	80 g
Na ₂ HPO ₄	0.48 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.98 g
MilliQ	up to 1.0 L

Perfusion buffer (PB-1)*

10× perfusion buffer	50 mL
HEPES	1.19 g
EGTA	0.114 g
Glucose	0.5 g
NaHCO ₃	0.645 g

Collagenase perfusion buffer**

PB-1 without EGTA	120 mL
100 mM CaCl ₂	4.8 mL
Collagenase	35 mg

*Adjust pH to 7.2 by adding 1 M HCl or 1 M NaOH, Sterilize with a 0.22 µm filter

**Adjust pH to 7.4 by adding 1 M HCl or 1 M NaOH, Sterilize with a 0.22 µm filter

4.2 ラット初代肝細胞のサンドイッチ培養

細胞を播種する plate には、予め type 1 collage (Rat Tail) にて collagen coating を施し

た。0.02N Acetic acid で調整した 0.05mg/mL collagen 溶液 100 μ L (96 well plate)、500 μ L (12well plate)、1 mL (6 well plate)を各 well へ塗布した。その後、室温で約 2 時間静置した。Collagen が gel 化したのを確認後、各 well へ 100 μ L (96 well plate)、500 μ L (12well plate)、1 mL (6 well plate)ずつ PBS(Arita-Moriok *et al.*)で 2 回洗浄する。なお、collagen coating は細胞播種の少なくとも 2 時間前に行った。

単離、精製を行った肝細胞を plating 用 WME 中に懸濁させ、collagen coating plate へ 1.25×10^5 cells/cm² の密度にて播種した。約 2 時間後、接着しなかった肝細胞を取り除くため、plating 用 WME にて培地交換を行った。播種後 24 時間にて plating 用 WME を除去、culturing 用 WME を用い 0.25 mg/mL になるように希釈した Matrigel を氷冷下で 100 μ L (96 well plate)、0.75 mL (12 well plate) 、1.5 mL (6well plate)ずつ各 well へ加え、サンドイッチ培養を開始した。その後は毎日、実験を行う培養 5 日目まで culturing 用 WME で培地交換を行った。播種後 5 日目まで肝細胞は 37°C、CO₂ incubator 内にて培養を行った。

Glucose-based culture medium

William's E medium

Antibiotic-antimycotic solution (100 \times)	1%
ITS+ Premix (100 \times)	1%
Dexamethasone	0.1 μ M
L-alanine-L-glutamine	2 mM
Antibiotic-antimycotic solution (100 \times)	1%

Galactose-based culture medium

Custom William's E medium	500ml
Antibiotic-antimycotic solution (100 \times)	1%
ITS+ Premix (100 \times)	1%
Dexamethasone	0.1 μ M
L-alanine-L-glutamine	2 mM
Antibiotic-antimycotic solution (100 \times)	1%
Galactose	10 mM

Plating medium

William's E medium

Fetal bovine serum	5%
Antibiotic-antimycotic solution (100 \times)	1%
Insulin	5 mg/L
Dexamethasone	1 mM

L-alanine-L-glutamine	2 mM
HEPES (pH 7.4)	15 mM

4.3 細胞毒性の測定

乳酸脱水素酵素 (LDH) は、すべての細胞に安定して存在する細胞質酵素で、細胞膜が傷害をうけるとすぐに培養上清中に放出され、培養上清中の LDH 活性が細胞毒性の指標となる。細胞を培養しているプレートを 1000rpm、3min にて遠心する。上清 20 μ L を新しい 96 well plate に回収し、60 μ L の MilliQ 水で希釈する。LDH 活性の測定は TaKaRa LDH cytotoxicity detection kit (TaKaRa Bio Inc., Shiga, Japan) を用いて行った。培養上清が入った 96 well plate を Shaker で攪拌しつつ、混合反応液を 80 μ L を添加し、遮光で 10min 反応させる。その後、反応停止液として、0.1N HCl を 40 μ L 加える。波長 490nm で吸光度を測定する Labsystems Multiskan JX multiwell plate reader。なお、LDH 活性は 0.25 % Triton X-100 を処置した細胞より漏出した LDH 活性を 100 % とし、以下の式に従って求めた

$$\text{LDH release (\% control)} = (\text{experiment} - \text{low control}) / (\text{high control} - \text{low control}) \times 100\%$$

Low control は 0.5% DMSO で処理した細胞から放出される LDH 活性になる。High control は 0.25% Triton X-100 溶液の添加により最大に放出される LDH 活性になる。

4.4 ATP 量測定

細胞内 ATP 量の測定は CellTiter-Glo luminescent cell viability assay (Promega, Madison, WI, USA) を用いて行った。培養上清を除去し、混合反応液を 100 μ L/well を添加し、Shaker で 3min 攪拌し、その後 7min 静置する。ルミネッセンス光強度は FilterMax multimode microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) で測定する。

4.5 酸素消費速度測定

酸素消費速度は fluorescent oxygen probe (Presens, Regensburg, Germany) を用いて測定した。測定する前に、専用プレートは測定機器の上に設置し、37°C、CO₂ incubator 内で 1 時間平衡化する。その後、新しい Glucose 培地及び galactose 培地に置換し、培地中の酸素濃度の経時変化を測定する。測定開始時の培地中の酸素濃度が 100% とし、測定が 5min ごとに行った。

4.6 乳酸産生量測定

細胞から培地中に放出した乳酸量の測定が、Talasniemi らの方法を一部変改し、酵素反応法で測定した(Talasniemi *et al.*, 2008)。12 well または 96 well plate で 24 時間培養した細胞の培養上清 65 μ L と perchloric acid 65 μ L 混合し除タンパクを行い、5000 g にて 10min、4 $^{\circ}$ C 遠心を行った。上清 80 μ L を新しいエッペンに移し、0.1N KOH (約 34.8 μ L) で pH 8 に調整し、氷上で 10min インキュベーションし、13000 g にて 10min、4 $^{\circ}$ C 遠心を行い、上清を回収する。96-well plate に回収した上清 20 μ L、glycylglycine-glutamate buffer (glycylglycine 0.6 M and glutamate 0.1 M, pH 10) 100 μ l、50 μ M NAD⁺ (nicotinamide adenine dinucleotide) 20 μ l、80 μ l MilliQ 水、0.5 μ l glutamate pyruvate transaminase (1400 U/ml) を入れ、シェーカーで混合する。各 well に 10 μ l LDH (400 U/ml) を入れ、37 $^{\circ}$ C で 30 min インキュベーションする。波長 340nm で吸光度を測定する。

4.7 活性酸素種産生量測定

各培養条件及び transferrin の添加による影響を調べるため、被験薬物存在下で活性酸素種の産生量を測定した。活性酸素種の測定は細胞透過性プローブ DCFH-DA を用いて行った。DCFH-DA が細胞に取り込まれるとエステラーゼによって脱アセチル化され、DCFH に変化します。DCFH は ROS によりすみやかに酸化されると、蛍光性の DCF に変化する。この蛍光をプレートリーダーで測定する。各条件下培養した細胞に all free Glucose 培地、all free galactose 培地または 6.25 μ g/ml transferrin を添加した上記の培地で 12 時間 pre インキュベーションし、その後、Glucose 含有 HBSS(Arita-Moriok *et al.*)及び galactose 含有 HBSS(Arita-Moriok *et al.*)で溶かした 50 μ M DCFH-DA を細胞に曝露し、37 $^{\circ}$ C で 45 min インキュベーションする。DCFH-DA を除去し、Glucose 含有 HBSS(Arita-Moriok *et al.*)及び galactose 含有 HBSS(Arita-Moriok *et al.*)で 1 回洗浄する。Transferrin-/ + の all free Glucose 培地及び all free galactose 培地で溶かした rotenone を細胞に曝露し、37 $^{\circ}$ C で 12 時間インキュベーションする。その後、波長 485/535 nm で蛍光強度を測定する(Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)。

4.8 ヒト凍結肝細胞のサンドイッチ培養

ヒト凍結肝細胞(Life Technologies, Grand Island, NY)は液体窒素で保存された状態から直ちに 37°C の水浴にて融解し、CHRM Medium (Life Technologies)に加え、100 g にて 10min、室温で遠心を行った。上清を除去し、plating 用 WME 中に肝細胞を懸濁させ、collagen coating plate へ 1.25×10^5 cells/cm² の密度にて播種した。約 2 時間後、接着しなかった肝細胞を取り除くため、plating 用 WME にて培地交換を行った。播種後 24 時間にて plating 用 WME を除去、culturing 用 WME を用い 0.25 mg/mL になるように希釈した Matrigel を氷冷下で 100 μ L (96 well plate) ずつ各 well へ加え、サンドイッチ培養を開始した。その後は毎日、実験を行う培養 5 日目まで culturing 用 WME で培地交換を行った。播種後 5 日目まで肝細胞は 37°C、CO₂ incubator 内にて培養を行った。

Donor Information	
Donor ID	Hu1437
Gender	Female
Age	70
Race	Caucasian

4.9 HepaRG 細胞の培養

分化した凍結 HepaRG 細胞(Biopredic International, Rennes, France)は液体窒素で保存された状態から直ちに 37°C の水浴にて融解し、HepaRG Thaw, Seed and General Purpose Medium 670 (Biopredic International, Rennes, France)に加え、360 g にて 2min、室温で遠心を行った。その後、Medium 670 で懸濁させ、collagen coating plate へ 0.72×10^5 cells/well (96 well plate)、 4.8×10^5 cells/well (24 well plate)の密度にて播種した。翌日から、Medium 670 を除去し、Add. Maintenance/Metabolism medium (ADD620043)を添加した free Glucose 培地、all free galactose 培地に置換し、二日間ごとに培地交換を行い、7 日目まで 37°C、CO₂ incubator 内にて培養を行った。

4.10 グルタチオン量の測定

12 well plate で培養した HepaRG 細胞は種々の条件下で 7 日間培養し、細胞内のグルタチオン量の変化を調べた。グルタチオン測定用のサンプル回収法は Nouredine らの方法を一部改変し行った(Bouaicha and Maatouk, 2004)。HepaRG 細胞を ice cold PBS(Arita-Moriok *et al.*) 1 mL で一回洗浄し、PBS(Arita-Moriok *et al.*) 0.5 mL/well を入

れ、スクリパーでエッペンに回収し、PBS(Arita-Moriok *et al.*) 0.5 mL/well もう一回入れ、エッペンに回収する。1000 g にて 5min、4°C で遠心を行い、上清除去し、T buffer (Na₂HPO₄ 100 mM, EDTA 1mM, pH 7.5) 40μL と 5% 5-Sulfosalicylic Acid 80μL を加え、sonication で細胞を破壊する。15000 g にて 15min、4°C で遠心を行い、上清をグルタチオン量の測定に持ち込む。グルタチオン測定用のサンプル 20 μL に対し、反応液 200 μL を加え、室温で 5min 震蕩し、その後、GSSG Reductase (8.5 IU/mL in stock buffer) を 40 μL ずつ加え、10 sec 震蕩する。20 sec 間隔で 405 nm で吸光度を測定する。グルタチオン量が各サンプルの吸光度増加の傾きで算出した。

GSH reaction solution

DTNB, 10mM in DMSO	1.0 mL
NADPH, 2 mM in MilliQ	1.7 mL
Stock Buffer (143 mM NaH ₂ PO ₄ , 6.3 mM EDTA-2Na, pH 7.4)	7.3 mL

4.11 mRNA 発現の測定

mRNA の抽出

12 または 24 well plate で培養した細胞に対し、ice cold PBS(Arita-Moriok *et al.*) 1 mL/well で 1 回 wash し、total RNA 抽出試薬 (RNAiso Plus, TAKARA, Japan) 0.5 mL/well を加え、細胞を剥離させ、エッペンに移し、室温で 5 min 間置く。クロロホルムを開始容量の 0.2 倍加え、5 sec ボルテックスし、室温で 5 min 間置く。12000rpm にて 4°C で 15min 間遠心する。上層の水層を新しい遠心チューブに移し、クロロホルムを開始容量の 0.2 倍をもう一回加え、5 sec ボルテックスし、12000 g にて 4°C で 5min 間遠心する。上層の水層を新しい遠心チューブに移し、開始容量の 0.5 倍のイソプロパノールを加えて混合し、室温で 10 min 間置く。12000 g にて 4°C で 10 min 間遠心する。上清除去し、75%エタノールを開始容量と同量加え洗浄する。7500 g にて 4°C で 5 min 間遠心し、上清を捨て、沈殿物を完全に乾燥させる。適量の DEPC 水を加え、溶解させたものを total RNA とした。調整した total RNA の濃度及び純度は total RNA の濃度 (ng/μL) = 40 (ng/μL) × 希釈倍率 × Absorbance (260 nm) として算出した(BioSpec-nano, SHIMADZU, Japan)。純度が(Abs 260 nm/ Abs 280 nm) = 1.7-1.9 の範囲にあるものを以降の実験に用いた。

逆転写

Total RNA の逆転写は ReverTra Ace qPCR RT Master Mix (Toyobo, Japan)を用いて行った。抽出した total RNA を 55°C で 5 min 間インキュベーションし、氷上で急冷することで RNA を変性させる。氷上にて、以下のように反応液を調製し、軽く攪拌して均一にした後、以下の温度で PCR をかける(LifeECO, Bioer Technology, NIPPON Genetics, Japan)。

5×RT Master Mix	2 μL	37°C	15 min
RNA template	1 μg	50°C	5 min
Nuclease-free water		98°C	5 min
Total	10 μL	4°C	hold

Real-time PCR 反応

Real-time PCR 反応は THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (Toyobo, Japan)を用いて行った。以下のように反応液を調製し、Real-time PCR 用の 8 連チューブに加え、軽く攪拌して均一にした後、以下の温度で PCR をかける(LightCycler Nano Real-Time PCR System, Roche Diagnostics)。

THUNDERBIRD		95°C	60 sec
SYBR qPCR Mix	5 μL	60°C	60 sec
cDNA*	2 μg	95°C	10 sec
Primer Mix**	2 μL	(go to 60°C 40 cycles)	
MilliQ	1 μL	97°C	0.1°C /sec
Total	10 μL		

*cDNA は逆転写産物の MilliQ で 10 倍希釈したものである。

**Primer Mix は Forward と Reverse primer 最終濃度 1.5 μM の Mixture である。

なお、使用した Real-time PCR の Primer の配列は以下の通りである

Target		Sequence (5' to 3')
human PK	Forward	CTGAAGGCAGTGATGTGGCC
	Reverse	ACCCGGAGGTCCACGTCCTC
human SOD2	Forward	AAGGGAGATGTTACAGCCCAGA
	Reverse	TCCAGAAAATGCTATGATTGATATGAC
human b-actin	Forward	TTCAACACCCCAGCCATGTACG
	Reverse	GTGGTGGTGAAGCTGTAGCC

4.12 BCA タンパク定量

タンパク定量が Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Hanover Park, IL, USA)により行った。各サンプル 20 μ L に対し、キットの reagent A と reagent B を 50 : 1 の割合で混合した反応液を 200 μ L ずつ加え、1 min 間攪拌した後、37°C で 30 min インキュベーションを行った。その後、室温に戻して再び 1 min 間攪拌し、波長 570 nm にて吸光度の測定を行った。

4.13 HepG2 細胞の培養

HepG2 は液体窒素で保存された状態から直ちに 37°C の水浴にて融解し、DMEM (FBS 10%、Antibiotic-antimycotic solution 1%)で懸濁させ、コラーゲンコートしたプレートへ 15%コンフルの密度にて播種した。翌日から、Glucose DMEM 培地 (25mM Glucose, 10% FBS)及び Galactose DMEM 培地 (10mM Galactose, 10% FBS)に置換し、二日間ごとに培地交換を行い、7日目まで 37°C、CO₂ incubator 内にて培養を行った。

参考文献

- Ainscow, E.K., Brand, M.D., 1999. Internal regulation of ATP turnover, glycolysis and oxidative phosphorylation in rat hepatocytes. *Eur. J. Biochem.* **266**, 737-749.
- Arita-Moriok, K., Yamanaka, K., Mizunoe, Y., Ogura, T., Sugimoto, S., 2015. Novel strategy for biofilm inhibition by using small molecules targeting molecular chaperone DnaK. *Antimicrob. Agents Chemother.* **59**, 633-641.
- Bader, A., Fruhauf, N., Tiedge, M., Drinkgern, M., De Bartolo, L., Borlak, J.T., Steinhoff, G., Haverich, A., 1999. Enhanced oxygen delivery reverses anaerobic metabolic states in prolonged sandwich rat hepatocyte culture. *Exp. Cell Res.* **246**, 221-232.
- Bissell, D.M., Levine, G.A., Bissell, M.J., 1978. Glucose metabolism by adult hepatocytes in primary culture and by cell lines from rat liver. *Am. J. Physiol.* **234**, C122-130.
- Bouaicha, N., Maatouk, I., 2004. Microcystin-LR and nodularin induce intracellular glutathione alteration, reactive oxygen species production and lipid peroxidation in primary cultured rat hepatocytes. *Toxicol. Lett.* **148**, 53-63.
- Brand, M.D., Nicholls, D.G., 2011. Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochem. J.* **435**, 297-312.
- Brieland, J.K., Clarke, S.J., Karmiol, S., Phan, S.H., Fantone, J.C., 1992. Transferrin - a potential source of iron for oxygen free radical-mediated endothelial-cell injury. *Arch. Biochem. Biophys.* **294**, 265-270.
- Che, R., Yuan, Y., Huang, S., Zhang, A., 2014. Mitochondrial dysfunction in the pathophysiology of renal diseases. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* **306**, F367-378.
- De Bruyn, T., Chatterjee, S., Fattah, S., Keemink, J., Nicolai, J., Augustijns, P., Annaert, P., 2013. Sandwich-cultured hepatocytes: utility for in vitro exploration of hepatobiliary drug disposition and drug-induced hepatotoxicity. *Expert. Opin. Drug Metab. Toxicol.* **9**, 589-616.
- Diaz-Ruiz, R., Rigoulet, M., Devin, A., 2011. The Warburg and Crabtree effects: On the origin of cancer cell energy metabolism and of yeast glucose repression. *Biochim. Biophys. Acta.* **1807**, 568-576.
- Dott, W., Mistry, P., Wright, J., Cain, K., Herbert, K.E., 2014. Modulation of mitochondrial bioenergetics in a skeletal muscle cell line model of mitochondrial toxicity. *Redox. Biol.* **2**, 224-233.
- Dykens, J.A., Jamieson, J., Marroquin, L., Nadanaciva, S., Billis, P.A., Will, Y., 2008. Biguanide-induced mitochondrial dysfunction yields increased lactate production and cytotoxicity of aerobically-poised HepG2 cells and human hepatocytes in vitro. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **233**, 203-210.
- Dykens, J.A., Will, Y., 2007. The significance of mitochondrial toxicity testing in drug development. *Drug Discov. Today* **12**, 777-785.
- Evenou, F., Fujii, T., Sakai, Y., 2010. Spontaneous formation of highly functional three-dimensional multilayer from human hepatoma HepG2 cells cultured on an oxygen-permeable polydimethylsiloxane membrane. *Tissue Eng. Part C Methods* **16**, 311-318.
- Fau, D., Eugene, D., Berson, A., Letteron, P., Fromenty, B., Fisch, C., Pessayre, D., 1994. Toxicity of the antiandrogen flutamide in isolated rat hepatocytes. *J. Pharmacol. Exp.*

- Ther. **269**, 954-962.
- Fromenty, B., Fisch, C., Berson, A., Letteron, P., Larrey, D., Pessayre, D., 1990. Dual effect of amiodarone on mitochondrial respiration. Initial protonophoric uncoupling effect followed by inhibition of the respiratory chain at the levels of complex I and complex II. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **255**, 1377-1384.
- Fu, D., Mitra, K., Sengupta, P., Jarnik, M., Lippincott-Schwartz, J., Arias, I.M., 2013. Coordinated elevation of mitochondrial oxidative phosphorylation and autophagy help drive hepatocyte polarization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **110**, 7288-7293.
- Fukae, J., Mizuno, Y., Hattori, N., 2007. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Mitochondrion* **7**, 58-62.
- Gerets, H.H., Tilmant, K., Gerin, B., Chanteux, H., Depelchin, B.O., Dhalluin, S., Atienzar, F.A., 2012. Characterization of primary human hepatocytes, HepG2 cells, and HepaRG cells at the mRNA level and CYP activity in response to inducers and their predictivity for the detection of human hepatotoxins. *Cell Biol. Toxicol.* **28**, 69-87.
- Godoy, P., Hewitt, N.J., Albrecht, U., Andersen, M.E., Ansari, N., Bhattacharya, S., Bode, J.G., Bolley, J., Borner, C., Bottger, J., Braeuning, A., Budinsky, R.A., Burkhardt, B., Cameron, N.R., Camussi, G., Cho, C.S., Choi, Y.J., Craig Rowlands, J., Dahmen, U., Damm, G., Dirsch, O., Donato, M.T., Dong, J., Dooley, S., Drasdo, D., Eakins, R., Ferreira, K.S., Fonsato, V., Fraczek, J., Gebhardt, R., Gibson, A., Glanemann, M., Goldring, C.E., Gomez-Lechon, M.J., Groothuis, G.M., Gustavsson, L., Guyot, C., Hallifax, D., Hammad, S., Hayward, A., Haussinger, D., Hellerbrand, C., Hewitt, P., Hoehme, S., Holzhutter, H.G., Houston, J.B., Hrach, J., Ito, K., Jaeschke, H., Keitel, V., Kelm, J.M., Kevin Park, B., Kordes, C., Kullak-Ublick, G.A., LeCluyse, E.L., Lu, P., Luebke-Wheeler, J., Lutz, A., Maltman, D.J., Matz-Soja, M., McMullen, P., Merfort, I., Messner, S., Meyer, C., Mwinyi, J., Naisbitt, D.J., Nussler, A.K., Olinga, P., Pampaloni, F., Pi, J., Pluta, L., Przyborski, S.A., Ramachandran, A., Rogiers, V., Rowe, C., Schelcher, C., Schmich, K., Schwarz, M., Singh, B., Stelzer, E.H., Stieger, B., Stober, R., Sugiyama, Y., Tetta, C., Thasler, W.E., Vanhaecke, T., Vinken, M., Weiss, T.S., Widera, A., Woods, C.G., Xu, J.J., Yarborough, K.M., Hengstler, J.G., 2013. Recent advances in 2D and 3D in vitro systems using primary hepatocytes, alternative hepatocyte sources and non-parenchymal liver cells and their use in investigating mechanisms of hepatotoxicity, cell signaling and ADME. *Arch Toxicol.* **87**, 1315-1530.
- Gu, Z., Nakamura, T., Lipton, S.A., 2010. Redox reactions induced by nitrosative stress mediate protein misfolding and mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases. *Mol. Neurobiol.* **41**, 55-72.
- Hynes, J., Nadanaciva, S., Swiss, R., Carey, C., Kirwan, S., Will, Y., 2013. A high-throughput dual parameter assay for assessing drug-induced mitochondrial dysfunction provides additional predictivity over two established mitochondrial toxicity assays. *Toxicol. In Vitro* **27**, 560-569.
- Ishiguro, H., Yasuda, K., Ishii, N., Ihara, K., Ohkubo, T., Hiyoshi, M., Ono, K., Senoo-Matsuda, N., Shinohara, O., Yosshii, F., Murakami, M., Hartman, P.S., Tsuda, M., 2001. Enhancement of oxidative damage to cultured cells and *Caenorhabditis elegans* by mitochondrial electron transport inhibitors. *IUBMB Life* **51**, 263-268.
- Kamimura, H., Ito, S., 2016. Assessment of chimeric mice with humanized livers in new drug

- development: generation of pharmacokinetics, metabolism and toxicity data for selecting the final candidate compound. *Xenobiotica* **46**, 557-569.
- Kaplowitz, N., 2005. Idiosyncratic drug hepatotoxicity. *Nat. Rev. Drug Discov.* **4**, 489-499.
- Kowaltowski, A.J., Vercesi, A.E., 1999. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* **26**, 463-471.
- Lane, R.S., Fu, Y., Matsuzaki, S., Kinter, M., Humphries, K.M., Griffin, T.M., 2015. Mitochondrial respiration and redox coupling in articular chondrocytes. *Arthritis Res Ther* **17**, 54.
- Lenaz, G., 1998. Role of mitochondria in oxidative stress and ageing. *Biochim. Biophys. Acta.* **1366**, 53-67.
- Li, N., Ragheb, K., Lawler, G., Sturgis, J., Rajwa, B., Melendez, J.A., Robinson, J.P., 2003. Mitochondrial complex I inhibitor rotenone induces apoptosis through enhancing mitochondrial reactive oxygen species production. *J. Biol. Chem.* **278**, 8516-8525.
- Lubberstedt, M., Muller-Vieira, U., Mayer, M., Biemel, K.M., Knospel, F., Knobeloch, D., Nussler, A.K., Gerlach, J.C., Zeilinger, K., 2011. HepaRG human hepatic cell line utility as a surrogate for primary human hepatocytes in drug metabolism assessment in vitro. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **63**, 59-68.
- Marchesini, G., Bua, V., Brunori, A., Bianchi, G., Pisi, P., Fabbri, A., Zoli, M., Pisi, E., 1988. Galactose elimination capacity and liver volume in aging man. *Hepatology* **8**, 1079-1083.
- Marroquin, L.D., Hynes, J., Dykens, J.A., Jamieson, J.D., Will, Y., 2007. Circumventing the Crabtree effect: replacing media glucose with galactose increases susceptibility of HepG2 cells to mitochondrial toxicants. *Toxicol. Sci.* **97**, 539-547.
- Martignoni, M., Groothuis, G.M., de Kanter, R., 2006. Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2**, 875-894.
- Masubuchi, Y., Nakayama, S., Horie, T., 2002. Role of mitochondrial permeability transition in diclofenac-induced hepatocyte injury in rats. *Hepatology* **35**, 544-551.
- McGinnity, D.F., Soars, M.G., Urbanowicz, R.A., Riley, R.J., 2004. Evaluation of fresh and cryopreserved hepatocytes as in vitro drug metabolism tools for the prediction of metabolic clearance. *Drug Metab. Dispos.* **32**, 1247-1253.
- Ogimura, E., Sekine, S., Horie, T., 2011. Bile salt export pump inhibitors are associated with bile acid-dependent drug-induced toxicity in sandwich-cultured hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **416**, 313-317.
- Pereira, C.V., Nadanaciva, S., Oliveira, P.J., Will, Y., 2012. The contribution of oxidative stress to drug-induced organ toxicity and its detection in vitro and in vivo. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **8**, 219-237.
- Pernelle, K., Le Guevel, R., Glaise, D., Stasio, C.G., Le Charpentier, T., Bouaita, B., Corlu, A., Guguen-Guillouzo, C., 2011. Automated detection of hepatotoxic compounds in human hepatocytes using HepaRG cells and image-based analysis of mitochondrial dysfunction with JC-1 dye. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **254**, 256-266.
- Pessayre, D., Fromenty, B., Berson, A., Robin, M.A., Letteron, P., Moreau, R., Mansouri, A., 2012. Central role of mitochondria in drug-induced liver injury. *Drug Metab. Rev.* **44**, 34-87.

- Rana, P., Anson, B., Engle, S., Will, Y., 2012. Characterization of human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes: bioenergetics and utilization in safety screening. *Toxicol. Sci.* **130**, 117-131.
- Rodriguez, R.J., Acosta, D., 1995. Comparison of ketoconazole-induced and fluconazole-induced hepatotoxicity in a primary culture system of rat hepatocytes. *Toxicology* **96**, 83-92.
- Rodriguez, R.J., Acosta, D., 1996. Inhibition of mitochondrial function in isolated rat liver mitochondria by azole antifungals. *J. Biochem. Toxicol.* **11**, 127-131.
- Rodriguez, R.J., Buckholz, C.J., 2003. Hepatotoxicity of ketoconazole in Sprague-Dawley rats: glutathione depletion, flavin-containing monooxygenases-mediated bioactivation and hepatic covalent binding. *Xenobiotica* **33**, 429-441.
- Rossignol, R., Gilkerson, R., Aggeler, R., Yamagata, K., Remington, S.J., Capaldi, R.A., 2004. Energy substrate modulates mitochondrial structure and oxidative capacity in cancer cells. *Cancer Res.* **64**, 985-993.
- Sakai, Y., Nishikawa, M., Evenou, F., Hamon, M., Huang, H., Montagne, K.P., Kojima, N., Fujii, T., Niino, T., 2012. Engineering of Implantable Liver Tissues. In: Ochiya, T. (Ed.), *Liver stem cells*. Springer, New York, pp. 189-216.
- Sardao, V.A., Pereira, S.L., Oliveira, P.J., 2008. Drug-induced mitochondrial dysfunction in cardiac and skeletal muscle injury. *Expert Opin. Drug Saf.* **7**, 129-146.
- Schoonen, W.G., Stevenson, J.C., Westerink, W.M., Horbach, G.J., 2012. Cytotoxic effects of 109 reference compounds on rat H4IIE and human HepG2 hepatocytes. III: Mechanistic assays on oxygen consumption with MitoXpress and NAD(P)H production with Alamar Blue. *Toxicol. In Vitro* **26**, 511-525.
- Sekine, S., Ito, K., Watanabe, H., Nakano, T., Moriya, K., Shintani, Y., Fujie, H., Tsutsumi, T., Miyoshi, H., Fujinaga, H., Shinzawa, S., Koike, K., Horie, T., 2015. Mitochondrial iron accumulation exacerbates hepatic toxicity caused by hepatitis C virus core protein. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **282**, 237-243.
- Shitara, Y., Nakamichi, N., Norioka, M., Shima, H., Kato, Y., Horie, T., 2013. Role of organic cation/carnitine transporter 1 in uptake of phenformin and inhibitory effect on complex I respiration in mitochondria. *Toxicol. Sci.* **132**, 32-42.
- Stephene, X., Najimi, M., Ngoc, D.K., Smets, F., Hue, L., Guigas, B., Sokal, E.M., 2007. Cryopreservation of human hepatocytes alters the mitochondrial respiratory chain complex I. *Cell Transplant* **16**, 409-419.
- Stevens, K.M., 1965. Oxygen requirements for liver cells in vitro. *Nature* **206**, 199.
- Susukida, T., Sekine, S., Nozaki, M., Tokizono, M., Oizumi, K., Horie, T., Ito, K., 2016. Establishment of a Drug-Induced, Bile Acid-Dependent Hepatotoxicity Model Using HepaRG Cells. *J. Pharm. Sci.* **105**, 1550-1560.
- Swift, B., Pfeifer, N.D., Brouwer, K.L., 2010. Sandwich-cultured hepatocytes: an in vitro model to evaluate hepatobiliary transporter-based drug interactions and hepatotoxicity. *Drug Metab. Rev.* **42**, 446-471.
- Talasniemi, J.P., Pennanen, S., Savolainen, H., Niskanen, L., Liesivuori, J., 2008. Analytical investigation: assay of D-lactate in diabetic plasma and urine. *Clin. Biochem.* **41**, 1099-1103.
- Varga, Z.V., Ferdinandy, P., Liaudet, L., Pacher, P., 2015. Drug-induced mitochondrial

- dysfunction and cardiotoxicity. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **309**, 1453-1467.
- Voet, D., Voet, J.G., 2011. Metabolism of hexoses other than glucose, *Biochemistry Fourth Edition*.
- Wagner, B.A., Venkataraman, S., Buettner, G.R., 2011. The rate of oxygen utilization by cells. *Free Radic. Biol. Med.* **51**, 700-712.
- Wang, D.S., Kusuhara, H., Kato, Y., Jonker, J.W., Schinkel, A.H., Sugiyama, Y., 2003. Involvement of organic cation transporter 1 in the lactic acidosis caused by metformin. *Mol. Pharmacol.* **63**, 844-848.
- Wang, X., Chen, X.J., 2015. A cytosolic network suppressing mitochondria-mediated proteostatic stress and cell death. *Nature* **524**, 481-484.
- Westerink, W.M.A., Schoonen, W.G.E.J., 2007. Cytochrome P450 enzyme levels in HepG2 cells and cryopreserved primary human hepatocytes and their induction in HepG2 cells. *Toxicol. in Vitro* **21**, 1581-1591.
- Wilkening, S., Bader, A., 2003. Influence of culture time on the expression of drug-metabolizing enzymes in primary human hepatocytes and hepatoma cell line HepG2. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **17**, 207-213.
- Yang, K., Guo, C., Woodhead, J.L., St Claire, R.L., 3rd, Watkins, P.B., Siler, S.Q., Howell, B.A., Brouwer, K.L., 2016. Sandwich-Cultured Hepatocytes as a Tool to Study Drug Disposition and Drug-Induced Liver Injury. *J Pharm Sci* **105**, 443-459.

主論文目録

本学位論文内容は下記の発表論文による。

Cong Liu, Shuichi Sekine, Kousei Ito. Assessment of mitochondrial dysfunction-related, drug-induced hepatotoxicity in primary rat hepatocytes. *Toxicology and Applied Pharmacology*, Apr 16; 302: 23-30 (2016)

Cong Liu, Shuichi Sekine, Binbin Song, Kousei Ito. Use of primary rat hepatocytes for prediction of drug-induced mitochondrial dysfunction. *Current Protocols in Toxicology*, 72, 14.16.1–14.16.10 (2017)

謝辞

本研究を遂行するにあたり、御懇篤なる御指導、御討論を賜りました千葉大学大学院薬学研究院生物薬剤学研究室 伊藤晃成 教授に心より厚く御礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり、終始御懇切なる直接の御指導、御鞭撻ならびに御討論を賜りました千葉大学大学院薬学研究院生物薬剤学研究室 関根秀一 講師に心より厚く御礼申し上げます。

本研究を行うにあたり、常に的確な御助言、御指導を賜りました千葉大学大学院薬学研究院生物薬剤学研究室 青木重樹 助教に心より厚く御礼申し上げます。

様々な面で御配慮を頂き、研究室生活を支えて頂いた諸先輩方、生物薬剤学研究室の皆様に深く感謝致します。

そして、本研究を遂行する上で犠牲になって頂いた多くの実験動物達に追悼の意を表すと共に、深く感謝致します。

最後に、今日まで御指導、御支援を頂きました数多くの方々、そして常に温かく見守り、支えて頂いた家族の皆様に心より御礼申し上げます。

2017年2月 吉日

劉 聡

審査委員

本学位論文の審査は千葉大学大学院薬学院で指名された下記の審査委員により行われた。

主査 千葉大学大学院教授（薬学研究院） 薬学博士 樋坂 章博

副査 千葉大学大学院教授（薬学研究院） 薬学博士 村山 俊彦

副査 千葉大学大学院教授（薬学研究院） 薬学博士 小椋 康光