

日本医療研究開発機構 医薬品等規制調和・評価研究事業  
事後評価報告書

公開

## I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) ヒト初代近位尿細管上皮細胞を用いた動態制御因子の誘導及びDIKI 評価系の開発  
(英語) Development of evaluation of drug-induced enzyme induction and kidney injury  
by primary culture of human renal proximal tubular cells

研究開発実施期間: 令和2年7月1日～令和5年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 荒川 大  
(英語) Hiroshi Arakawa

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:  
(日本語) 金沢大学・医薬保健研究域薬学系・准教授  
(英語) Faculty of Pharmacy, Institute of Medical, Pharmaceutical and Health Sciences, Kanazawa  
University, associate professor

## II 研究開発の概要

研究開発の成果およびその意義等

**背景及び目的** 薬物誘発性腎障害 (DIKI)の発症は、薬物治療方針決定において大きな問題となる。薬物の研究開発において、DIKI の評価は主に実験動物を用いて検討されている。しかし、その予測制度が低いことが課題として挙げられており、ヒト細胞を用いた DIKI の *in vitro* 評価系の樹立が切望されている。DIKI を考慮する際、薬物の細胞内蓄積量とそれに伴う細胞応答が重要な因子となる。薬物の細胞内蓄積量は、薬物トランスポーター及び代謝酵素といった薬物動態制御因子が主要な支配要因となり、またそれらの発現量は、薬物や内因性化合物の細胞内濃度の影響を受ける。そこで、本検討では有機アニオントランスポーター OAT1 などの薬物トランスポーター発現量が生理的な腎皮質に近い三次元培養ヒト近位尿細管上皮細胞 (3D-hRPTEC) を用いた *in vitro* DIKI 評価系の構築を行った。

**成果及び意義** DIKI を評価する際、薬物曝露後に細胞が *in vivo* を反映する細胞応答を示す必要がある。そこで、3D-hRPTEC の ATP 合成の代謝経路を調べた。各種 ATP 合成阻害剤を用いた細胞毒性試験を行った

結果、3D-hRPTEC は解糖系及びグルコースから代謝されたピルビン酸を利用したクエン酸回路によって ATP 合成を行なっていることが示された。また、3D 培養系では 2D 培養系よりも好氣的呼吸活性が高いことが示された。さらに、3D-hRPTEC を細胞毒性試験に用いる上で、細胞系の安定性について調べた。3D-hRPTEC は 28 日までの長期的な培養が可能であることが示され、その培養期間において細胞形態及びその内径に大きな変化はなかった。また、2D 培養系と比較し、3D-hRPTEC では培養 28 日まで主要な薬物トランスポーターである OAT1 及び OCT2 の mRNA 発現量は有意に高かった。このため、3D-hRPTEC は従来の培養系よりも薬物トランスポーター活性を考慮した細胞毒性試験を実施できることが示唆された。そこで 3D-hRPTEC が OAT1 及び OCT2 を介した DIKI を評価できるかを調べるため、OAT1 基質 tenofovir 及び OCT2 基質 cisplatin を用いた細胞毒性試験を行った。その結果、3D 培養系では 2D 培養系よりも tenofovir 及び cisplatin の曝露により高い ATP 量低下作用を示した。また、3D 培養系における tenofovir 及び cisplatin による ATP 量低下は、それぞれ OAT1 阻害剤 probenecid 及び OCT2 阻害剤 cimetidine により軽減した。このため、3D-hRPTEC は OAT1 及び OCT2 を介した DIKI を 2D 培養系よりも高感度に評価可能であることが示された。

3D-hRPTEC の *in vitro* DIKI 評価系としての有用性をさらに追求するため、細胞内 ATP 量を指標として 32 種の DIKI 誘発化合物を用いた細胞毒性試験を行なった。腎毒性の評価手法として、細胞内 ATP 量の 20%減少濃度 ( $EC_{20}$  値)を算出し、臨床最大血中濃度 ( $C_{max}$ ) の 100 倍以内となる場合は陽性とした。 $EC_{20}$  値を用いて解析を行った結果、21 種の DIKI 陽性化合物のうち、7 日曝露では 14 種、28 日間曝露では 16 種の薬物で陽性を示し、陽性化合物を陽性として判断できる感度 (sensitivity) はそれぞれ 66.7%及び 76.2% となった。また細胞内 ATP 量の低下を示した薬物の  $EC_{20}$  値は 7 日間曝露よりも 28 日間曝露でより低い値となった。このため、28 日間曝露は 7 日間曝露よりも感度の高い毒性評価が可能であることが示された。一方、DIKI 陰性化合物を陰性として検出できた特異度 (specificity) は 7 日間曝露で 100%、28 日間曝露で 90.9%となった。さらに、HK-2 細胞を用いて 3 日間の細胞毒性試験を行ったところ感度は 57.1%、特異度は 90.9%と示された。以上の検討から、細胞内 ATP 量の測定が *in vitro* DIKI 評価において有用なバイオマーカーとなることが示され、また 3D-hRPTEC は従来系の HK-2 細胞よりも高い感度を示す細胞毒性試験系であることが示された。

一方、cyclosporine A など ATP 量の減少が観察されない薬物が一部見出され、これら薬物の DIKI 評価を可能な毒性マーカーを明らかにすることで、より広い種類の DIKI を評価可能になることが期待された。そこで、3D-RPTEC の細胞内 ATP 量の低下作用を持たなかった薬物による毒性を検出可能なマーカーの探索を行った。cyclosporine A を含む 4 種の薬物を 3D-RPTEC に曝露し、培地および細胞内タンパク質を抽出し、各種腎毒性および細胞障害マーカー 9 種 (TGF- $\beta$ 、M-CSF、clusterin、Kim-1、IL-1 $\beta$ 、IL-18、FABP1、TFF3、HO-1) について ELISA 法を用いて定量を行なった。その結果、曝露した薬物すべてにおいて細胞内タンパク質 HO-1 のタンパク質発現量が上昇する結果が得られた。また、細胞障害の前駆状態をより広く把握することを目的に、共焦点イメージサイトメーターを用いた画像診断による毒性評価手法の構築を行った。Cyclosporine A など ATP の低下を示さなかった化合物を含む DIKI 陽性化合物 14 種、及び DIKI 陰性化合物 8 種を 3D-hRPTEC に曝露し、種々のオルガネラ染色試薬を用いてその輝度値の変動を評価した。その結果、曝露 1 日後にミトコンドリア、酸化ストレス、リソソーム、小胞体のマーカーの輝度値が cyclosporine A 濃度依存的に増加し、画像診断を行うことで、ATP の減少よりも早期に毒性の前駆状態を評価できる可能性が示された。

得られた成果をもとに、細胞内 ATP 量と画像診断の組み合わせによる DIKI 評価を行った。7 日間の薬物曝露実験において ATP 単独での感度 66.7%に対し、細胞内 ATP 量と画像診断を合わせた解析を行うことで感度が 95.2%まで増加した。このため ATP と画像診断を併用することでより広い DIKI 陽性化合物を判定できることが示された。一方、特異度が ATP 単独の場合は 100%となった一方、細胞内 ATP 量と画像診断

を合わせた解析では 72.7%となった。このため、用いる画像診断マーカーや閾値の最適化が今後の課題として挙げられた。

DIKI を考慮する際、上述の通り薬物の細胞内蓄積量が重要な因子となる。薬物の細胞内蓄積量は、薬物トランスポーター及び代謝酵素といった薬物動態制御因子が主要な支配要因となり、またそれらの発現量は、薬物や内因性化合物の細胞内濃度の影響を受ける。そこで、3D-hRPTEC を用いて薬物動態制御因子の誘導評価を行う細胞培養法の確立を行った。種々の転写因子・核内受容体に対するリガンドを 3D-hRPTEC に処置したところ、2D-hRPTEC と比較して典型的な標的遺伝子の発現誘導がより大きく認められた。また、2D-hRPTEC では認められなかった転写因子・核内受容体活性化による各種薬物トランスポーターの発現変動が、三次元培養することで認められるようになった。したがって、3D-hRPTEC は有用な薬物動態制御因子の誘導評価系となることが示された。また、抗 HIV 薬 tenofovir は、近位尿細管上皮細胞の細胞膜に発現するトランスポーターである OAT1 によって細胞内に取り込まれ、細胞毒性を引き起こす。核内受容体に対するリガンドによって 3D-hRPTEC における OAT1 と OAT3 発現量が顕著に低下し、それに伴う tenofovir の細胞内取り込みの低下ならびにその細胞毒性の軽減が認められた。さらに、3D-hRPTEC を用いた CUT & RUN 法を新規に確立し、OAT1 ならびに OAT3 の発現変動メカニズムを追求した。以上より、3D-hRPTEC を用いることで薬物動態制御因子の誘導試験が可能となり、また OAT1 の発現量変化に伴う薬物毒性の変化を捉えることに成功した。

**Purpose** Drug-induced kidney injury (DIKI) is a major cause of kidney disease and accounts for approximately 20% of acute kidney injury. In addition, DIKI is a major cause of drug attrition especially during clinical stages of drug development in pharmaceutical industries. DIKI has been evaluated by animal studies in preclinical development stage. However, highly predictive *in vitro* DIKI evaluation systems are desirable from the aspect of species differences and animal welfare. Kidney is composed of diverse cells, but renal proximal tubular epithelial cells (RPTEC) express transporters essential for drug disposition in kidney and are also sensitive to disruptions in oxidative phosphorylation. Thus, RPTEC considered as the primary target site for DIKI. Conventional two-dimensional cultured primary human proximal tubule epithelial cells (2D-hRPTEC) and immortalized cell lines such as HK-2 cells are currently used for DIKI evaluation. However, these cells have low level of expression of transporters compared with human renal cortex and low kidney physiological response such as aerobic respiration by mitochondria. On the other hand, three-dimensional cultured human RPTEC (3D-hRPTEC) shows expression levels of major drug transporters comparable to those of human renal cortex. This study aimed to propose that 3D-hRPTEC is a useful *in vitro* evaluation method for preclinical studies during drug development.

**Results and Significance** 3D-hRPTEC showed significantly higher expression of major drug transporters organic anion transporter 1 (OAT1) and organic cation transporter 2 (OCT2) than 2D-hRPTEC over 28 days cultivation. ATP reduction by exposure to OATs substrate tenofovir and OCT2 substrate cisplatin in 3D-RPTEC was more significant than those observed in 2D-hRPTEC. In addition, ATP content in 3D-RPTEC was reduced in a cultivation time-dependent manner up to 28 days. Moreover, ATP reduction by exposure to various nephrotoxic drugs was more significant at 28 days than at 7 days. Compared to HK-2 cells, 3D-hRPTEC showed a higher sensitivities and specificities, indicating the usefulness of 3D-RPTEC for DIKI evaluation. On the other hand, ATP content in 3D-RPTEC was not reduced by seven out of twenty-one nephrotoxicants until 7 days. TO overcome the challenges, high content analysis using specific fluorescence probe compounds for organelles was performed after exposure to nephrotoxicants in 3D-hRPTEC. As a result, significant differences in mitochondrial reactive

oxygen species between nephrotoxicants and non-nephrotoxicants. Furthermore, an evaluation system for induction of pharmacokinetics-related proteins in the human kidney was established using 3D-hRPTEC. Activation of transcriptional factors or nuclear receptors changed expression levels of various drug transporters in 3D-hRPTEC but not in 2D-hRPTEC, suggesting the utility of 3D-hRPTEC in evaluating induction of pharmacokinetics-related factors. Treatment with a ligand of a nuclear receptor markedly decreased OAT1 and OAT3 expression level in 3D-hRPTEC but not in 2D-hRPTEC, leading to attenuation of uptake of tenofovir into the 3D-hRPTEC and mitigation of its toxicity. To address the regulatory mechanism for OAT1 and OAT3 expression, CUT & RUN assay using 3D-hRPTEC was established. Collectively, 3D-hRPTEC is useful *in vitro* tool for evaluation of an induction of pharmacokinetics-related proteins.