

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) ゲノム編集技術と MPS 技術を用いた初回通過効果予測モデルの構築
(英語) Development of a first-pass effect prediction model using genome editing
and MPS technologies

研究開発実施期間: 令和3年7月1日～令和6年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 根来 亮介
(英語) Negoro Ryosuke

研究開発代表者 所属機関・部署・役職: 学校法人立命館 立命館大学薬学部薬学科・助教
(日本語) 学校法人立命館 立命館大学薬学部薬学科・助教
(英語) College of Pharmaceutical Sciences, Ritsumeikan University・Assistant Professor

II 研究開発の概要

本研究開発課題では、研究開発項目 1: 薬物代謝酵素を高発現した HepG2 細胞および Caco-2 細胞の作製、研究開発項目 2: Micro physiological system (MPS) を用いた初回通過効果評価モデルの構築を通して創薬研究における初回通過効果を予測するための細胞および腸-肝チップ開発に取り組んだ。

非臨床試験において、医薬品の初回通過効果を予測するために、ヒト結腸癌由来細胞株である Caco-2 細胞やヒト初代培養肝細胞などが用いられている。しかしながら、Caco-2 細胞やヒト初代培養肝細胞は下記の様な問題点を有する。

Caco-2 細胞の問題点

薬物代謝に重要な役割を果たすシトクロム P450 (CYP) 3A4 などがほとんど発現していない。

ヒト初代培養肝細胞の問題点

ロット差が非常に大きい点、長期間の培養で薬物代謝能が著しく減弱する。また、ヒト初代培養肝細胞の代替として、安価に再現良く長期間培養できるヒト肝がん由来細胞株である HepG2 細胞の使用も考えられるが、様々な薬物代謝酵素の発現量が極めて低い。

初回通過効果の予測値を算出するために、腸であれば Caco-2 細胞のみで実験を行い消化管吸収率の予測を行う。肝であればヒト初代培養肝細胞を用いて肝代謝や肝毒性の試験を行う。そのため、生体を模倣するような腸から肝への薬物移行を加味した実験を行えていないため、正確に初回通過効果できないことが重大な問題となっている。

そこで本研究課題では、ゲノム編集技術を駆使して、Caco-2 細胞および HepG2 細胞にヒトと比べ発現量の低い複数の薬物代謝酵素の遺伝子発現カセットを挿入することで、安価に再現性良く創薬研究に応用できるモデルを構築した。初回通過効果を一つの実験系で評価するために、MPS を用いた。本研究で作製した細胞を MPS デバイスに搭載し、生体を模倣するように腸-肝チップを作製し、一つの評価系で初回通過効果を予測できるか検討した。

研究開発項目 1: 薬物代謝酵素を高発現した HepG2 細胞および Caco-2 細胞の作製

CYP1A2、2C9、2C19、2D6、3A4 の 5 分子による代謝を受けた後に、UGT1A1 などにより抱合反応を受ける医薬品は多い。そこで、HepG2 細胞にゲノム編集技術である PITCH システムを用いて、セーフ・ハーバー部位である AAVS1 座位などを標的に相同組換えを利用して、上記の薬物代謝酵素の遺伝子発現カセットのノックインを試みた。POR は、CYPs の代謝に必須な補酵素であるため POR も過剰発現させる。なお、ヒト小腸において、CYP3A4 の発現量が全 CYPs 中 80%以上を占めるため、Caco-2 細胞においては、CYP3A4、POR および UGT1A1 を高発現させた。作製したゲノム編集 HepG2 細胞および ゲノム編集 Caco-2 細胞の薬物代謝酵素活性の評価を行った。

薬物代謝能を評価するための基質は以下の薬物を使用した。

CYP1A2 代謝活性: フェナセチンからアセトアミノフェンへの代謝

CYP2C9 代謝活性: ジクロフェナクから 4-ヒドロキシジクロフェナクへの代謝

CYP2C19 代謝活性: (S)-メフェニトインから(±)-4-ヒドロキシメフェニトインへの代謝

CYP2D6 代謝活性: ブフラロールから 1-ヒドロキシブフラロールへの代謝

CYP3A4 代謝活性: ミダゾラムから 1-ヒドロキシミダゾラムへの代謝

UGT1A1 代謝活性: β -Estradiol から Estradiol 3-glucuronide (E2-3G) あるいは、7-OH クマリン から 7-OH クマリン G への代謝

その結果、ゲノム編集 Caco-2 細胞における CYP3A4 および UGT1A1 代謝能は WT Caco-2 細胞に比べ、十分に高い薬物代謝活性を有していた。ヒト小腸 S9 とゲノム編集 Caco-2 細胞における UGT1A1 代謝能は同程度の活性を有した。一方で、CYP3A4 活性は、1/10 程度であった。

ゲノム編集 HepG2 細胞における CYP1A2, 2C9, 2C19, 2D6, 3A4, UGT1A1 活性は、WT HepG2 細胞に比べ、十分に高い薬物代謝活性を有していた。また、48 時間培養したヒト初代培養肝細胞とゲノム編集 HepG2 細胞の CYP2C19 活性は同程度であった。さらに、CYP3A4 により代謝され毒性が増強する アミオダロンや CYP2C9 により代謝され毒性が増強するベンズブロマロンを用いて肝毒性試験を行った結果、WT HepG2 細胞と比べ、ゲノム編集 HepG2 細胞の細胞生存率は減少した。従って、ゲノム編集技術を用いて複数の薬物代謝酵素を高発現した HepG2 細胞および Caco-2 細胞の作製に成功した。さらに、ゲノム編集した薬物代謝酵素は機能的であることを示した。

研究開発項目 2: MPS を用いた初回通過効果評価モデルの構築

ゲノム編集した細胞を MPS に搭載するために、polydimethylsiloxane (PDMS) 素材を用いたマイクロ流体デバイスの top channel にはゲノム編集 Caco-2 細胞を播種し、bottom channel にはゲノム編集 HepG2 細胞を播種することで、腸-肝 チップを作製した。マイクロ流体デバイスにゲノム編集 HepG2 細胞およびゲノム編集 Caco-2 細胞を搭載し、培養できているか評価するために、位相差顕微鏡での観察、遺伝子発現量を解析した。位相差顕微鏡での観察の結果、形態に変化はなかった。PDMS デバイス上に単独でゲノム編集 HepG2 細胞あるいはゲノム編集 Caco-2 細胞を培養した条件と top channel にゲノム編集 Caco-2 細胞を播種し、bottom channel にゲノム編集 HepG2 細胞を播種した条件と比較して、腸管上皮細胞マーカー、肝細胞マーカー、薬物代謝酵素の遺伝子発現量に変化はなかった。

腸-肝 チップが初回通過効果を予測できるか以下のモデル薬物を用いて検討した。

初回通過効果の影響を受けやすい医薬品 ($F < 0.3$): プロプラノロール

中程度初回通過効果の影響を受けやすい医薬品 ($0.3 < F < 0.7$): ジクロフェナク

初回通過効果の影響を受けにくい医薬品 ($0.7 < F$): アセトアミノフェン

その結果、初回通過効果の影響を受けにくい医薬品であるアセトアミノフェンの透過量は、WT-腸-肝チップとゲノム編集腸-肝チップで差がなかった。中程度初回通過効果を受けやすい医薬品であるジクロフェナクにおいて、WT-腸-肝チップでは、ほとんど代謝物を検出できなかったが、ゲノム編集腸-肝チップでは時間依存的にその代謝物が増加した。初回通過効果を受けやすい医薬品であるプロプラノロールの bottom チャンネルの濃度は、WT-腸-肝チップに比べゲノム編集腸-肝チップでは低い濃度を示した。以上の結果より、ゲノム編集腸-肝チップは新たな in vitro 初回通過効果予測モデルになりうる可能性を示した。

なお、本研究課題の成果の一部は、下記の学術論文にて公表した。

- 1) Keita Watanabe#, **Ryosuke Negoro#***, Takuya Fujita. 5-ALA treatment increases intracellular heme levels and enhances CYP3A4 activity in genome-edited Caco-2 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 664, 94–99 (2023). # These authors contributed equally to this work. *Corresponding author.
- 2) Naoki Yamada#, **Ryosuke Negoro#***, Keita Watanabe, Takuya Fujita. Generation of Caco-2 cells with predictable metabolism by CYP3A4, UGT1A1 and CES using the PITCh system. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 100497 (2023). # These authors contributed equally to this work. *Corresponding author.
- 3) **Ryosuke Negoro#***, Mitsuki Tasaka#, Sayaka Deguchi, Kazuo Takayama, Takuya Fujita. Generation of HepG2 Cells with High Expression of Multiple Drug-Metabolizing Enzymes for Drug Discovery Research Using a PITCh System. *Cells*, 11, 1677 (2022).
These authors contributed equally to this work. *Corresponding author.

- 4) **Ryosuke Negoro**^{#*}, Naoki Yamada[#], Keita Watanabe, Yusuke Kono, Takuya Fujita. Generation of Caco-2 cells stably expressing CYP3A4·POR·UGT1A1 and CYP3A4·POR·UGT1A1*6 using a PITCh system. *Arch. Toxicol.*, 96, 499–510 (2022).

[#] These authors contributed equally to this work. ^{*}Corresponding author.

This research project involved developing cell and gut-liver chips to predict first-pass effects in drug discovery research by the following process: item 1: Generation of HepG2 and Caco-2 cells with high expression of drug-metabolizing enzymes and item 2: Constructing the first-pass effect evaluation model using Micro physiological system (MPS).

Item 1: Generation of HepG2 and Caco-2 cells with high expression of drug-metabolizing enzymes

Many drugs are metabolized by Cytochrome P450 (CYP) 1A2, 2C9, 2C19, 2D6, and 3A4, and undergo conjugation reactions by UGT1A1. Therefore, we attempted to knock in gene expression cassettes for several drug-metabolizing enzymes in HepG2 cells and Caco-2 cells using the Precise Integration into Target Chromosome (PITCh) system, a genome editing technology. P450 oxidoreductase (POR) was also overexpressed as it is an essential cofactor for the metabolism of CYPs. The activities of several drug-metabolizing enzymes in genome-edited HepG2 and genome-edited Caco-2 cells were sufficiently high compared to non-genome-edited cells. These results suggest that we have successfully generated genome-edited HepG2 and Caco-2 cells with high drug-metabolizing capacity.

Item 2: Constructing the first-pass effect evaluation model using Micro physiological system (MPS)

An intestine-liver chip was fabricated by seeding genome-edited Caco-2 cells in the top channel and genome-edited HepG2 cells in the bottom channel of a microfluidic device made of polydimethylsiloxane (PDMS). We analyzed gene expression levels of drug-metabolizing enzymes in genome-edited HepG2 and genome-edited Caco-2 cells on PDMS devices. There was no change in gene expression of drug-metabolizing enzymes under conditions where genome-edited HepG2 or genome-edited Caco-2 cells were cultured alone on the PDMS device, compared with conditions where genome-edited Caco-2 cells were seeded on the top channel and genome-edited HepG2 cells on the bottom channel. The following model drugs were used to investigate whether the intestine-liver chip could predict first-passage effects.

Drugs susceptible to first-pass effects ($F < 0.3$): Propranolol

Drugs moderately susceptible to first-pass effects ($0.3 < F < 0.7$): Diclofenac

Drugs less susceptible to first-pass effects ($0.7 < F$): Acetaminophen

The results showed that there was no difference in the amount of acetaminophen, a drug that is less susceptible to first-passage effects, transmitted between the WT intestine-liver chip and the genome-edited intestine-liver chip. For diclofenac, a drug moderately susceptible to first-passage effects, few metabolites could be detected in the WT intestine-liver chip, whereas their metabolites increased in a time-dependent manner in the genome-edited intestine-liver chip. Concentrations in the bottom channel of propranolol, a drug susceptible to first-pass effects, showed lower concentrations in the genome-edited intestine-liver chip compared to the WT intestine-liver chip. These results indicate that the genome-edited intestine-liver chip may be a new model for predicting in vitro first-pass effects.