

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) icHep 細胞を用いた胆汁中排泄過程の評価システムの構築  
(英語) Construction of evaluation system for in vitro drug biliary excretion

研究開発実施期間: 令和 4 年 8 月 1 日～令和 7 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) 国立大学法人金沢大学・医薬保健研究域薬学系・准教授  
(英語) Kanazawa University・Faculty of Pharmacy, Institute of Medical, Pharmaceutical and Health Sciences・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

和文：

**背景および目的** 薬物の胆汁中排泄過程は、「医薬品開発と適正な情報提供のための薬物相互作用ガイドライン」(薬生薬審発 0723 第 6 号)にも評価を行うことの重要性が記載されているものの、胆汁中排泄クリアランスの推定が可能な *in vitro* 肝細胞系が存在せず、精密な評価を行うことができない。そこで本課題ではヒト胆汁中排泄クリアランスを定量的に予測可能な新規の *in vitro* 肝細胞培養モデルの構築を目指した。研究アプローチとして、①透過試験法により薬物の胆汁中排泄が評価可能なヒト肝細胞培養モデル構築を行い、本細胞系を用いて②薬物の胆汁中排泄クリアランス、及び③胆汁排泄トランスポーターを介した薬物相互作用の予測・評価手法の構築を行った。

### 成果及び意義

研究開発項目 1 : icHep 細胞の培養方法の確立 claudin-1 の合成時に界面活性剤を添加して合成するが、培養機材へコーティング後は界面活性剤が取り除かれるため膜タンパク質の凝集が観察されていた。このため claudin-1 と作用できない肝細胞が生じことが懸念された。そこで、界面活性剤を用いることなく膜タンパク質を溶解可能な脂質ディスクを用いて claudin-1 タンパク質の合成をおこなった。脂質ディスクに封入した claudin-1 タンパク質を培養器材へコーティングしたところ、均一な claudin-1 タンパク質のコーティングが観察された。加えて、培養器材の最適化についても検討を行った。4 種のセルカルチャーインサートの利用により、claudin-1 をコートして作成した icHep 系の胆汁中排泄活性を MRP2 基質 estradiol-17 $\beta$ glucuronide (E2-17 $\beta$ G)および密着結合形成を tritc-dextran 4000 (TD4)の輸送活性を指標にそれぞれ調べた。その結果、セルカルチャーインサートの開孔率向上に伴い TD4 の透過性は向上した。またポアサイズが 3.0  $\mu$ m と比較し 0.4  $\mu$ m で E2-17 $\beta$ G の輸送活性が高値を示した。E2-17 $\beta$ G の輸送には細胞取り込みを介した輸送と細胞間隙輸送の 2 つの過程が含まれる。そこで TD4 の透過性を細胞間隙輸送として E2-17 $\beta$ G の透過性から差し引くと、0.4  $\mu$ m のインサート膜で開孔率 0.25%と 12.5%の E2-17 $\beta$ G の経細胞輸送 (collagen 条件と icHep 条件の比率) は同程度となった。このためどちらのインサート膜を用いても同等の結果が得られると考えられたが、細胞の状態を明視野顕微鏡より容易に観察できることから、開孔率 0.25%のインサート膜を用いることとした。

また、*in vitro-in vivo* 補外が可能なラットを用い、ラット肝細胞を用いた icHep 系の樹立を行った。ラット claudin-1 を無細胞合成系より *in vitro* 合成し、培養プレートにコートした。さらにラットより単離した初代肝細胞培養器材に播種し、ラット MRP2 抗体を用いて MRP2 の染色を行った。その結果、MRP2 染色が半円状の形態として観察され、開放系胆管腔が形成された。一方、ラット肝細胞をセルカルチャーインサートに播種したところ死細胞が多く観察され、培養方法の最適化を行った。ラット肝細胞はヒトと比較し酸素要求性が高いことから、セルカルチャーインサートの下側を気層として培養を行った。その結果、培養に伴う細胞死が軽減された。透過試験を実施したところ TD4 の透過性はヒト icHep と同程度となり、このため細胞単層が適切に形成されていると考えられた。また、E2-17 $\beta$ G などの胆汁排泄トランスポーター基質を用いて透過試験を行った結果、collagen コート条件と比較し、わずかな増加が観察された。限定的な胆汁排泄活性が認められたが、初代ラット肝細胞の培養方法の最適化による薬物トランスポーター活性の向上が課題として挙げられた。

研究開発項目 2 : *in vivo* 胆汁中排泄過程の予測手法の構築 胆汁排泄クリアランスが臨床報告されている薬物 7 種 (cimetidine, digoxin, erythromycin, methotrexate, nafcillin, SN-38, vincristine) を用いて、icHep

系により透過クリアランスを算出した。得られた透過クリアランスより算出した薬物胆汁中排泄クリアランスを臨床報告値比較した結果、良好な相関性を示した。このため、icHep 系を用い、ヒト胆汁排泄クリアランスが既知の化合物を指標とすることで、未知化合物のヒト胆汁排泄クリアランスを予測できる可能性が示された。

### 研究開発項目 3：胆汁排泄トランスポーターを介した薬物相互作用の評価手法の構築

胆汁排泄トランスポーター（MRP2、P-gp、BSEP）の推奨基質の設定を行うことを目的に、それぞれのトランスポーターに対して選択性の高い基質を用いた透過試験を行った。MRP2 の基質として E2-178G を用いた透過試験を行ったところ、MRP2 阻害剤 benzobromarone の添加により半分程度まで透過性が低下し、MRP2 介在性の輸送が示された。同様に P-gp 基質として digoxin、BSEP 基質として taurocholate の透過試験を行い、それぞれの阻害剤である zosuquidar 及び chlorpromazine により透過性が低下した。

また、創薬安全性の課題の一つである薬物代謝反応に関わる薬物誘発性胆汁うっ滞評価について icHep 系の有用性を調べた。Candesartan cilexetil は親化合物が BSEP を阻害し、活性代謝物 candesartan が BSEP を阻害しない性質を持つ。そこでモデル基質として candesartan cilexetil を選択し、活性体への変換に関与する阻害剤コリンエステラーゼ阻害薬を阻害した際の胆汁酸胆汁への影響を調べた。icHep 系を用いて taurocholate の透過試験を行ったところ candesartan cilexetil の添加は taurocholate の透過性に影響しなかった。一方、candesartan cilexetil とコリンエステラーゼ阻害薬を共に添加することにより、taurocholate の透過性は低下した。代謝物生成量が taurocholate の輸送に影響を与えるかを調べるため、親化合物と代謝物の肝細胞内量を定量し、taurocholate の透過性との相関を調べた。その結果、taurocholate の透過性の低下は細胞内の candesartan cilexetil 濃度と相関した一方、candesartan とは相関しなかった。以上より、icHep を用いることで透過試験系により代謝過程が関与する薬物誘発性胆汁うっ滞を評価できることが示された。

さらに、評価系の安定性と結果の再現性の確認 2 つの PXB 細胞ロットを用いて icHep 系を作成したところ、MRP2、P-gp 及び BSEP を介した胆汁中排泄輸が確認された。また icHep 系を用いた胆汁排泄活性のバッチ差を調べた。その結果、E2-178G 及び taurocholate の透過性の CV 値は 20%以下となった。

本研究開発課題の遂行により、ヒト肝細胞を用いた透過試験により薬物胆汁排泄クリアランスを推定可能な *in vitro* 評価系の構築に成功した。また、創薬安全性評価で課題となる薬物代謝過程が関与する薬物誘発性胆汁うっ滞の評価や、酵素誘導の評価も可能であることが示された。

英文：

**Background and Objectives:** Although the importance of evaluating the biliary excretion process of drugs is stated in the “Guideline on drug interaction for drug development and appropriate provision of information”, there is no *in vitro* hepatic cell system that can estimate biliary excretion clearance with precise evaluation. This project aimed to construct a novel *in vitro* hepatocyte culture model capable of quantitatively predicting the clearance of human biliary excretion by permeation assay. Using this cell system, we developed a method for predicting and evaluating the clearance of drugs in bile excretion and drug-drug interactions via bile excretion transporters.

## Results and Significance

For establishment of a culture method for icHep cells, we synthesized claudin-1 protein with lipid discs that can dissolve membrane proteins without surfactant. When claudin-1 protein was encapsulated in lipid discs and coated onto culture media, a uniform coating of claudin-1 protein was observed. Moreover, four different cell culture inserts were used to optimize the biliary excretory activity of the claudin-1-coated icHep system, using MRP2 substrate estradiol-17 $\beta$ glucuronide (E2-17 $\beta$ G) and para-cellular marker tritc-dextran 4000 (TD4). The permeability of TD4 increased with increasing the pore size of the cell culture insert, and the transport activity of E2-17 $\beta$ G was higher at a pore size of 0.4  $\mu$ m than at a pore size of 3.0  $\mu$ m. In addition, rats capable of *in vitro-in vivo* complementation were used to establish an icHep system using rat hepatocytes. Rat claudin-1 was synthesized *in vitro* using a cell-free synthesis system and coated on culture plates. The cells were then seeded into primary hepatocyte culture media isolated from rats and stained for MRP2 using rat MRP2 antibody. As a result, MRP2 staining was observed as a semicircular morphology, forming an open system bile duct lumen. Permeability assays using bile excretion transporter substrates such as E2-17 $\beta$ G showed a slight increase compared to the collagen-coated condition. Although limited biliary excretion activity was observed, the optimization of the primary rat hepatocyte culture method to improve drug transporter activity was identified as an issue to be addressed.

For development of a method for predicting the *in vivo* biliary excretion process, the drug permeation clearance was calculated by the icHep system. The results of comparison of drug biliary clearance calculated from the obtained permeation clearance with the clinically reported values showed a good correlation. Therefore, the icHep system may be used to predict the human biliary clearance of unknown compounds.

The usefulness of the icHep system for the evaluation of drug-induced cholestasis involving drug metabolism was also investigated. Candesartan cilexetil, the parent compound, inhibits bile acid transporter BSEP, while its active metabolite candesartan does not inhibit BSEP. The addition of candesartan cilexetil did not affect the permeability of taurocholate. On the other hand, the addition of both candesartan cilexetil and esterase inhibitor decreased the permeability of taurocholate. Furthermore, batch differences in biliary excretory activity using the icHep system were also examined. The results showed that the CV values of permeability of E2-17 $\beta$ G and taurocholate were less than 20%.

By carrying out this project, we succeeded in establishing an *in vitro* evaluation system that can estimate drug biliary excretion clearance by a permeability test using human hepatocytes.