

● HepaRG®細胞を用いた CYP 誘導能評価試験

TN397

Evaluation of CYP Induction Using HepaRG® Cells

[概要]

ヒト肝腫瘍由来細胞株である HepaRG®細胞はヒト肝細胞様形態を呈しており、チトクロム P450 (CYP) 活性を始めとした各種肝機能を安定して発現し、細胞ロット間差が小さく、入手が容易であることから、創薬初期段階での CYP 誘導能評価試験に適した細胞です。当社では、HepaRG®細胞を用いた信頼性の高い CYP 誘導能評価試験の受託サービスを行っております。以下に、「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」¹⁾で推奨されている mRNA レベルで評価した実施例を示します。

Keywords: 薬物動態、HTS、酵素誘導、リアルタイム PCR

[背景]

医薬品開発において、薬物の吸収、分布、代謝、排泄の何れの過程においても起こり得る薬物相互作用の検証は大きな課題です。なかでも代謝における薬物相互作用が最も多く認められ、薬物代謝酵素である CYP が主な原因となっています。CYP を誘導する薬物は、CYP により代謝される薬物の血中濃度を低下させ、薬効を減弱させてしまいます。CYP 誘導能の評価には、一般的にヒト肝細胞が用いられますが、創薬初期段階のスクリーニングで使用するには、薬物代謝酵素のロット間差が大きい、高価である等の課題があります。

[実施例]

72 時間培養した HepaRG®細胞およびヒト凍結肝細胞の培養液に、CYP1A2、2B6 および 3A4 の代表的な誘導剤である Omeprazole、Phenobarbital および Rifampicin をそれぞれ添加し 48 時間後に mRNA 量を測定し、誘導能 (Fold induction; 誘導倍率^{※1)}) を評価しました (Fig.1)。この結果から、HepaRG®細胞における誘導倍率は、凍結ヒト肝細胞と同程度もしくはそれ以上であり、CYP 誘導能評価試験に活用可能であることが確認できました。

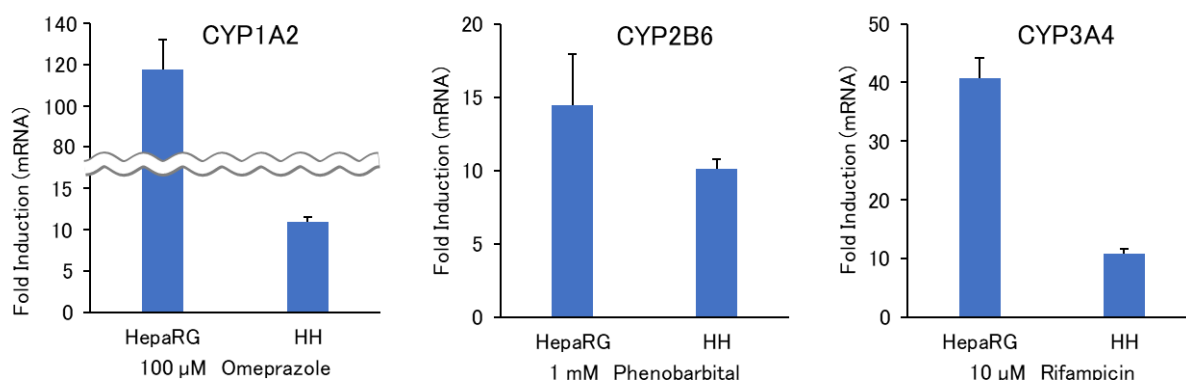


Fig.1. Comparison of HepaRG® cells and Cryopreserved Human Hepatocytes (HH) by CYP inducibility (CYP1A2, 2B6, 3A4)

さらに CYP3A4 を誘導することが知られている Rifampicin、Phenobarbital および Carbamazepine について、HepaRG®細胞を用いて mRNA を指標として CYP3A4 誘導能を評価し、用量反応曲線より EC₅₀ (50%効果濃度) 値と E_{max} (最大効果) 値を求めました (Fig.2)。その結果、Rifampicin、Phenobarbital および Carbamazepine の EC₅₀ 値はそれぞれ 0.624 μM、211 μM、43.1 μM と、凍結ヒト肝細胞での報告値 (0.56 μM、239 μM、36 μM) ¹⁾ と同等の値を示しました。

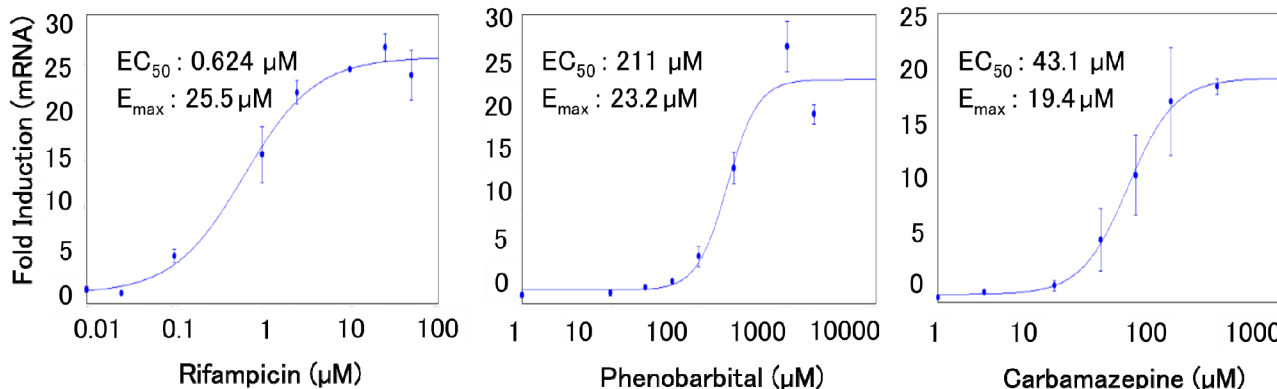


Fig.2. Dose - response curve of CYP3A4 induction assay (Rifampicin, Phenobarbital, Carbamazepine)

Relative Induction Score (RIS^{※2}) は CYP 誘導による相互作用リスクを定量的に予測するための指標として用いられており、用量反応曲線より得られた EC₅₀ 値および E_{max} 値に、化合物の有効血中濃度 (C_{eff}) を考慮することで算出することが可能です ²⁾。Fig. 3 は、*in vitro* と *in vivo* 試験結果の相関関係を調べるために、本評価により算出した各種化合物の CYP3A4 に対する RIS と、それらの化合物を臨床において併用した際の CYP3A4 基質である Ethinyl Estradiol の AUC (area under blood concentration-time curve) 減少率 (%) ³⁾ をプロットしたものです。HepaRG®細胞を用いて算出した RIS と、臨床における AUC 減少率 (%) の間には良好な相関関係が認められました。

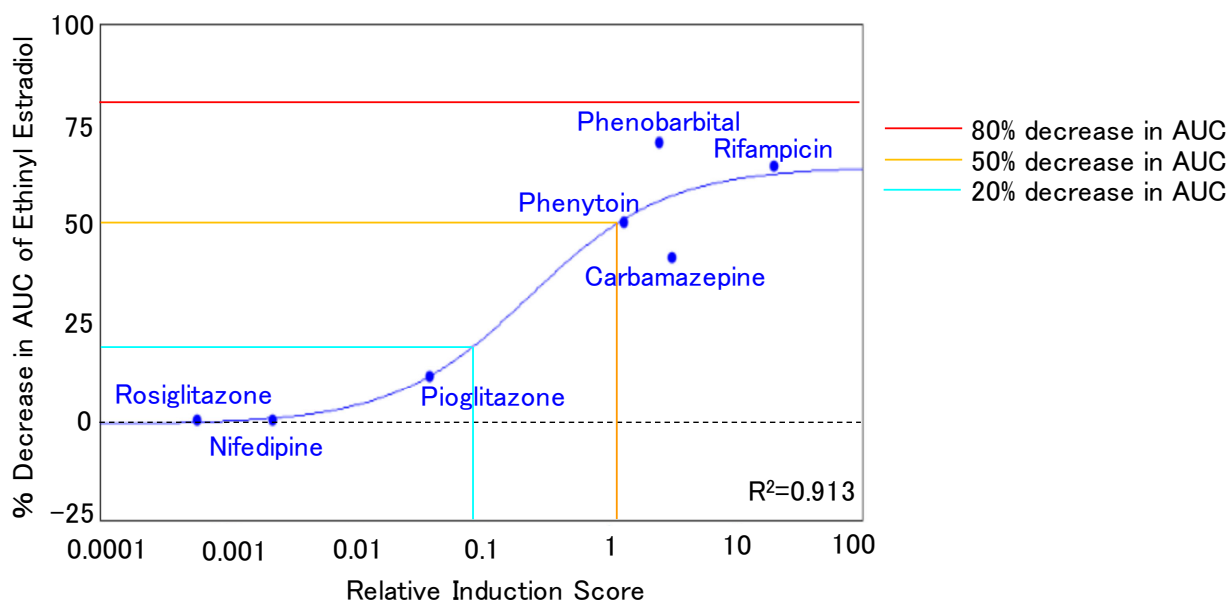


Fig. 3. *in vivo*-*in vitro* correlation (% Decrease in AUC³⁾ versus RIS by 4-Parameter Logistic curve)

以上の結果から、HepaRG®細胞を用いた CYP 誘導能評価試験は、信頼性が高く、薬物相互作用の予測にも利用できることが検証できました。

* HepaRG®は BIOPREDIC 社の登録商標です。

※1 誘導倍率 (Fold induction) = $2^{-\Delta\Delta Ct}$

$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ (テストサンプル) - ΔCt (溶媒コントロール)

$\Delta Ct = Ct$ (標的遺伝子) - Ct (リファレンス遺伝子)

標的遺伝子 : CYP1A2、CYP2B6、CYP3A4

リファレンス遺伝子 : GAPDH

Ct : Threshold Cycle の略。リアルタイム PCR で測定した反応の蛍光シグナルが Threshold Line と交差する時点のサイクル数。

※2 $RIS = (C_{eff} \times E_{max}) / (C_{eff} + EC_{50})^4$

[文 献]

- 1) 厚生労働省 : 薬生薬審発 0723 第 4 号, ” 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(平成 30 年 7 月 23 日) ”
- 2) Tsutsui, et al.: *Biol.Pharm.Bull*, **44**, 338, (2021)
- 3) Kato, et al.: *Drug Metab Pharmacokinet*, **20**, 236, (2005)
- 4) Ripp, et al.: *Drug Metab Dispos*, **34**, 1742, (2006)

[関連技術リンク]

ヒト肝細胞を用いた *in vitro* CYP 誘導能評価系の構築

<https://www.scas.co.jp/technical-informations/technical-news/pdf/tn394.pdf>