

Application Note 1

Cellartis® Enhanced hiPS-HEPにおけるCYP酵素の発現

はじめに

ヒト人工多能性幹細胞 (hiPSC) 由来の肝細胞は、適正なレベルの肝機能数値を示し、創薬研究の初期段階でヒトセルベースアッセイに利用できる可能性があります。しかし、CYPなど複数の薬物代謝酵素について高発現を要求するアプリケーションへの適用には、hiPSC由来肝細胞の能力はまだ十分ではありませんでした。

Cellartis® Enhanced hiPS-HEPはhiPSC (ChiPS18) 由来の肝細胞です。成人肝臓細胞の特徴を示し、従来のhiPSC由来肝細胞と比較して代謝における第1相反応酵素群の発現が大幅にアップしています。

Application Note 1では、Cellartis® Enhanced hiPS-HEPにおける薬物代謝酵素の発現に関するデータを示します。

【材料および方法】

細胞培養

ユーザーマニュアルに従いCellartis® Enhanced hiPS-HEP (from ChiPS18) を融解して播種し、培養した。

CYP活性測定

Cellartis® Enhanced hiPS-HEPのCYP活性を、融解～培養6日後、11日後に測定した。

0.1% PEST、25 mM HEPES、および2 mM L-グルタミンを含むWilliams Medium E (WME) で希釈した標的基質の混合物 (表2) と、各細胞を2時間反応させた。

LC/MS (Pharmacelsus GmbHで実施) を用いて、各CYP酵素による代謝産物の生成を測定した。

- ・ CYP1A : Paracetamol (別名Acetaminophen)
- ・ CYP2B6 : OH-Bupropion
- ・ CYP2C9 : OH-Diclofenac
- ・ CYP2C19 : OH-Mephenytoin
- ・ CYP2D6 : OH-Bufuralol
- ・ CYP3A : OH-Midazolam

LC/MSで測定した代謝産物濃度は、ウェルごとのタンパク質量 (Pierce BCA Protein Assay Kitを用いて測定) と反応時間 (120分) で正規化している。

表2. CYP活性測定のための基質と濃度

CYP	Substrate	Assay concentration
1A	Phenacetin	10 μ M
2B6	Bupropion	10 μ M
2C19	Mephenytoin	50 μ M
2C9	Diclofenac	10 μ M
2D6	Bufuralol	10 μ M
3A	Midazolam	5 μ M

RT-qPCR

播種7日後と11日後のCellartis® Enhanced hiPS-HEPから、MagMAX-96 Total RNA Isolation Kit (Life Technologies) を用いてtotal RNAを抽出した。

cDNAを合成し、TaqMan® Gene Expression AssaysおよびApplied Biosystems 7500 Real-Time PCR System (以上、Life Technologies) を用いてRT-qPCR反応を行い、CYP3A4 (Hs00604506_m1)、CYP3A5 (Hs00241417_m1)、ならびにCYP3A7 (Hs00426361_m1) 遺伝子の発現を解析した (n=2)。

ウェスタンブロット

Cellartis® Enhanced hiPS-HEPを融解しT75フラスコに播種した後、ウェスタンブロット解析用の細胞ペレットとして回収するまで8日間培養した。CYP450酵素とP450還元酵素の検出には以下の抗体を使用した。

- ・ウサギ抗CYP3A4抗体 (1,000倍、Cypex社; PAP 011)
- ・ウサギ抗CYP2C抗体 (抗ヒトCYP2C C末端ペプチド抗体、1,000倍、R. Edwards博士よりご提供)
- ・ウサギ抗CYP2C19抗体 (1,000倍、Sigma-Aldrich社; HPA015066)
- ・ウサギ抗P450還元酵素抗体 (1,000倍、Sigma-Aldrich社; ab13513, Abcam)

ウェスタンブロット解析は、Cellartis® Enhanced hiPS-HEPの2バッチについて、各細胞溶解物の上清 (800 \times gで遠心分画) をレーンあたり15 μ gずつアプライして実施した。ヒト肝臓マイクロソームを対照コントロールとして比較定量した。

免疫細胞化学染色 (ICC)

Cellartis® Enhanced hiPS-HEPを播種し7日間培養した後固定し、以下の一次抗体および二次抗体で免疫染色した。

- ・ウサギ抗CYP1A2抗体 (100倍、Enzo社; BML-CR3130)
- ・ウサギ抗CYP2C9抗体 (2,500倍、Cypex社; PAP 091)
- ・ウサギ抗CYP3A4抗体 (200倍、Cypex社; PAP 011)
- ・ロバ抗ウサギAlexa Fluor 594 IgG標識抗体 (1,000倍、Invitrogen社; A21207)

【結果】

凍結品のCellartis® Enhanced hiPS-HEPを融解し、6日または11日間培養後に測定したCYP1A、CYP2C9の活性値は、20時間培養したヒト初代肝細胞 (cryo hphep) で検出された活性値と近い値を示し、CYP3Aは非常に高い活性値レベルを示しました。【図13】

Cellartis® Enhanced hiPS-HEPのCYP活性は、培養6日後から11日後までの6日間安定していました。また、CYP活性レベルは5バッチ間で一貫性が見られました。【図18】

さらに、CYP3A4、3A5、3A7の発現をRT-qPCRにより調べたところ、Cellartis® Enhanced hiPS-HEPでは成人型酵素のCYP3A4とCYP3A5が凍結保存されたヒト初代肝細胞と同等のレベルで発現していました。一方、胎児型酵素のCYP3A7は、ヒト初代肝細胞よりCellartis® Enhanced hiPS-HEPで低い発現レベルを示しました。【図14】

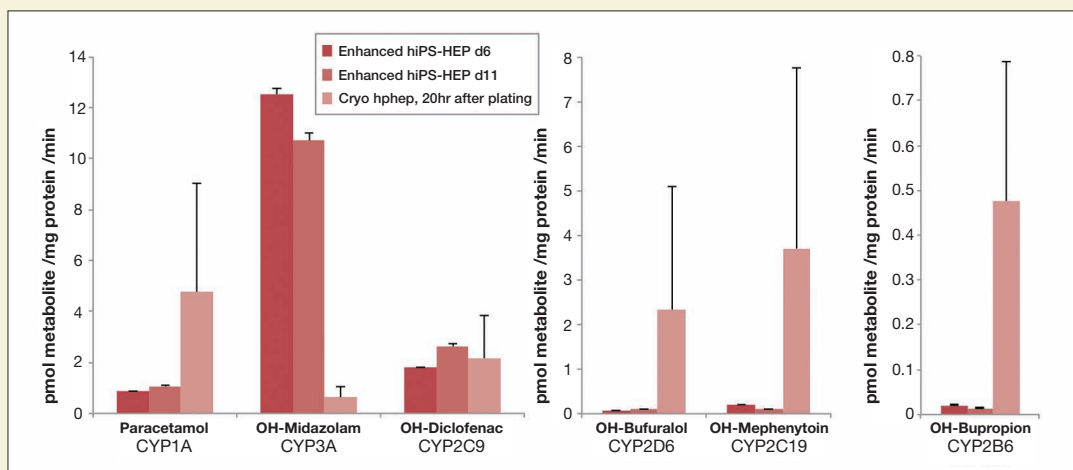


図13. Cellartis Enhanced hiPS-HEP (融解～培養6日後および11日後) と初代ヒト肝細胞 (cryo hphep) のCYP活性比較
Cellartis Enhanced hiPS-HEP (n=5バッチ)、cryo hphep (n=異なるドナー4名)。各活性測定値は、平均値±標準誤差で示す。

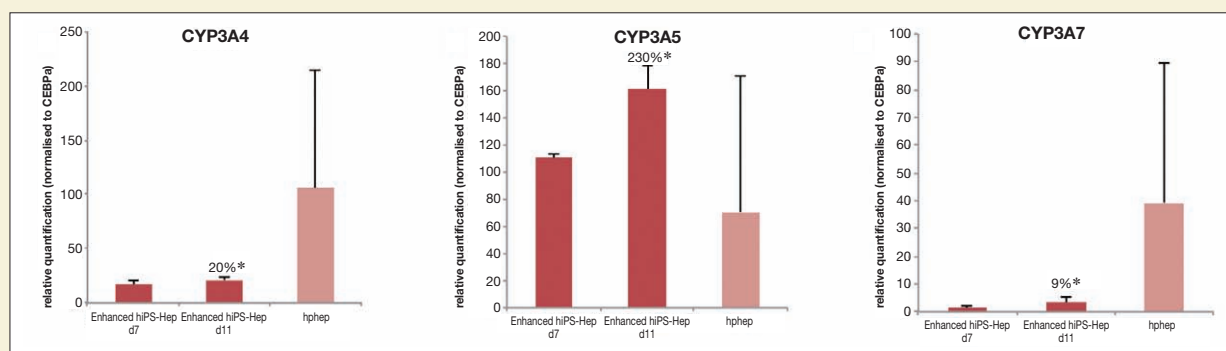


図14. CYP3A4、CYP3A5、CYP3A7の発現量をRT-qPCRで比較

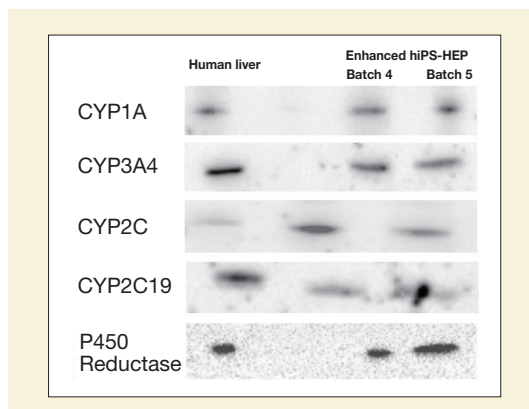
融解直後(0時間)のヒト初代肝細胞 (cryo hphep) とCellartis Enhanced hiPS-HEP (培養7日後および11日後) についてCYP3A4、CYP3A5、CYP3A7 mRNAの発現量を比較した。Cellartis Enhanced hiPS-HEP (n=3バッチ)、Cryo hphep (n=異なるドナー5名)。
* : hphep (0時間、融解直後) の発現量に対する相対%を示す。

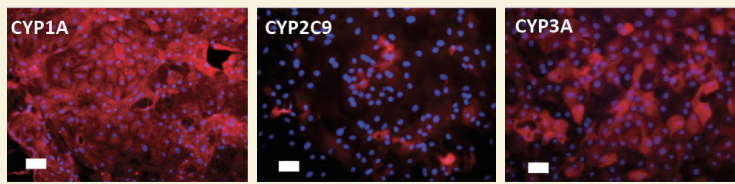
ウェスタンブロット解析の結果、Cellartis® Enhanced hiPS-HEP におけるCYP1A、CYP3A4、CYP2C、CYP2C19およびP450還元酵素の発現は、ヒト肝臓ミクロソームにおける発現量に匹敵することが明らかとなりました。【図15】

免疫細胞化学染色では、Cellartis® Enhanced hiPS-HEPでのCYP1A、CYP2C9、およびCYP3Aの発現が確認できました。

【図16】

図15. Cellartis Enhanced hiPS-HEPとヒト肝臓ミクロソームにおけるCYP発現のウェスタンブロット解析
Enhanced hiPS-HEPの異なる2バッチを解析した。ウェスタンブロット解析はカロリンスカ研究所(スウェーデン)で実施した。





スケールバー=50 μm

図16. Cellartis Enhanced hiPS-HEPにおけるCYP1A、CYP2C9、CYP3Aの免疫細胞化学染色像（融解～培養7日後）
対比染色：核染色（DAPI）

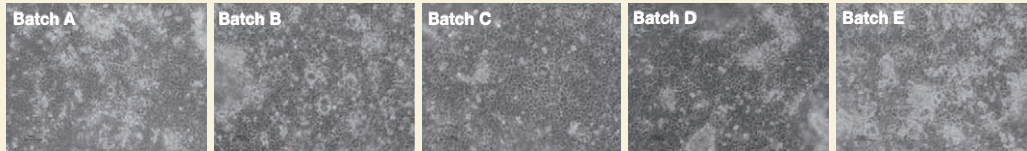


図17. Cellartis Enhanced hiPS-HEP 5バッチの細胞形態観察（融解～培養6日後）

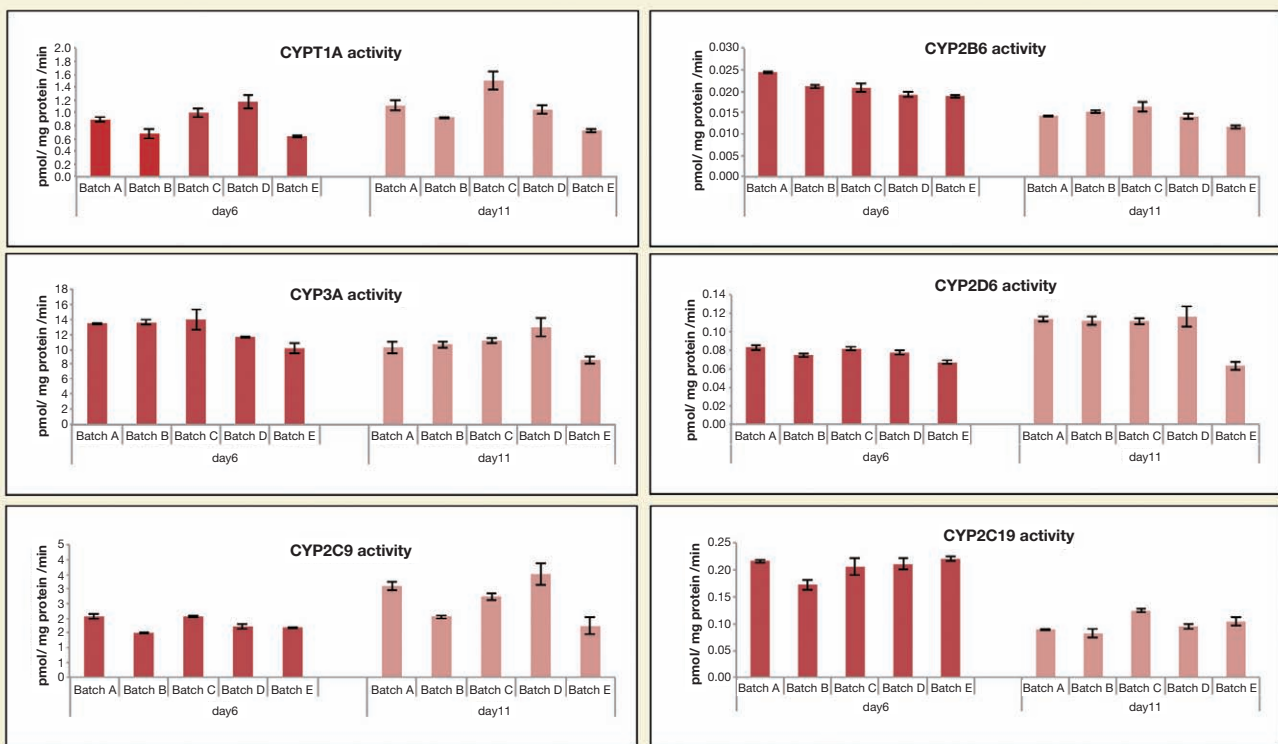


図18. Cellartis Enhanced hiPS-HEP 5バッチのCYP活性測定（融解～培養6日後および11日後）
各バッチについてn=3で解析を行った。各CYP活性値は平均値±標準誤差を示す。

結論

Cellartis® Enhanced hiPS-HEPについて、酵素活性測定、ウェスタンブロット、免疫細胞化学染色およびRT-qPCRの各解析を実施し、代謝に関連する機能的なCYP酵素の発現を検出しました。
CYP活性レベルと細胞の均質性は各バッチ間で一貫性が見られました（肝細胞の純度は90%以上）。
Cellartis® Enhanced hiPS-HEPはヒト肝細胞のソースとして無限に活用でき、代謝関連酵素のCYP活性や、再現性のある解析プラットフォーム、同一の遺伝的背景をもつ材料の安定供給を必要とする場合に有用です。