

Application Note 2

Cellartis® Enhanced hiPS-HEPを用いた肝毒性機構研究のためのイメージングによるHigh Content Analysis (HCA)

はじめに

Cellartis® Enhanced hiPS-HEPはヒト人工多能性幹細胞由来の均一な肝細胞で、凍結保存されたヒト肝細胞と同様の機能的な薬物代謝酵素の発現がみられます。Application Note 2では、肝細胞の特徴をもつ有望な細胞源として、Cellartis® Enhanced hiPS-HEPがイメージングによるハイコンテンツ解析 (HCA) での利用に適していることを示します。

【方法】

細胞培養

ユーザーマニュアルに従って凍結品のCellartis® Enhanced hiPS-HEP (from ChiPS18) を融解し、96ウェルイメージングプレート (Nunc社 165305) に播種した。細胞の単層シートを得るため、各ウェルには細胞を90,000~95,000個播いた。一日おきに培地交換しながら、5日間培養した後、毒性試験を開始した。

毒性試験とHCA

Cellartis® Enhanced hiPS-HEPを、臨床的意義のある肝毒性化合物 (Amiodarone、Disulfiram、Nefazodone、およびPerhexiline)、非肝毒性化合物 (Bosentan、Metformin、およびPioglitazone) に曝露した。DMSO 1%を含む暴露液中の各化合物の濃度は、0.3、0.5、1、3、5、10、30、50、100、300 μMと漸増させた。曝露24時間後、細胞を蛍光プローブで染色 (表3) し、固定化した。

続いてThermoFisher ArrayScan VTI high content imagerを用いて各蛍光プローブによる標識結果を取り込み、ThermoFisher BioApplication V4統合ソフトウェアで解析した。各ウェルについて6画像を取り込み、化合物と暴露量の細胞への影響を解析した。データは溶媒対照を100%とした割合で示す (平均値±標準誤差、n=6)。

表3. 蛍光プローブとモニター対象

Probe	Read-out
Hoechst	Nuclei counts
LysoTracker Green	Lysosomal activity
MitoTracker Orange	Mitochondrial membrane potential
TOTO-3	Plasma membrane integrity

【結果】

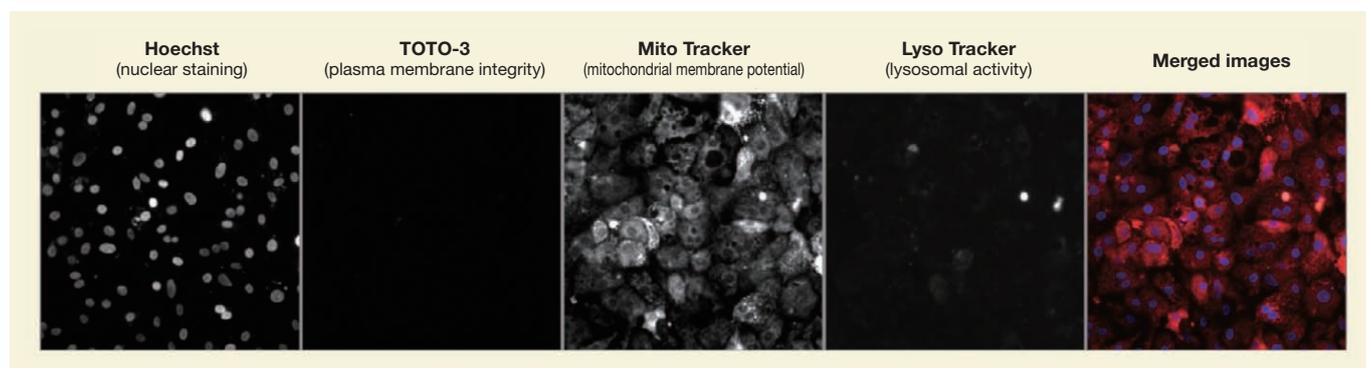
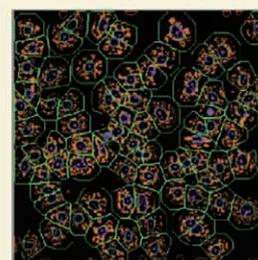


図19. 播種5日後のCellartis Enhanced hiPS-HEPコントロール細胞のHCAモニター画像
HCAはCellartis Enhanced hiPS-HEP単層培養で容易に実施できた。

Data analysis of merged images



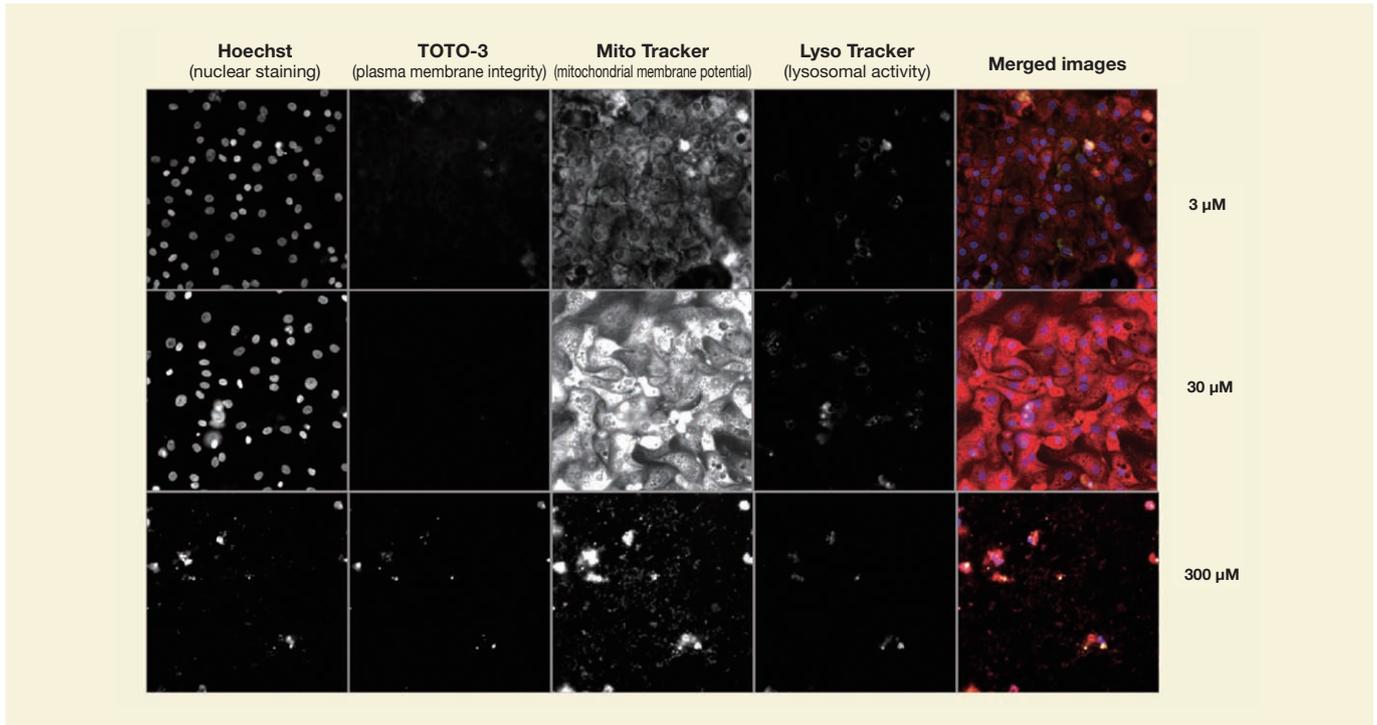


図20. 3、30、300 μMのAmiodarone曝露24時間後のCellartis Enhanced hiPS-HEPのHCAモニター画像
Amiodaroneはミトコンドリアの機能障害を誘発し、30 μMでミトコンドリア膜電位の過分極が認められた。最大曝露量(300 μM)では、細胞毒性によりウェルから細胞の剥落が生じた。

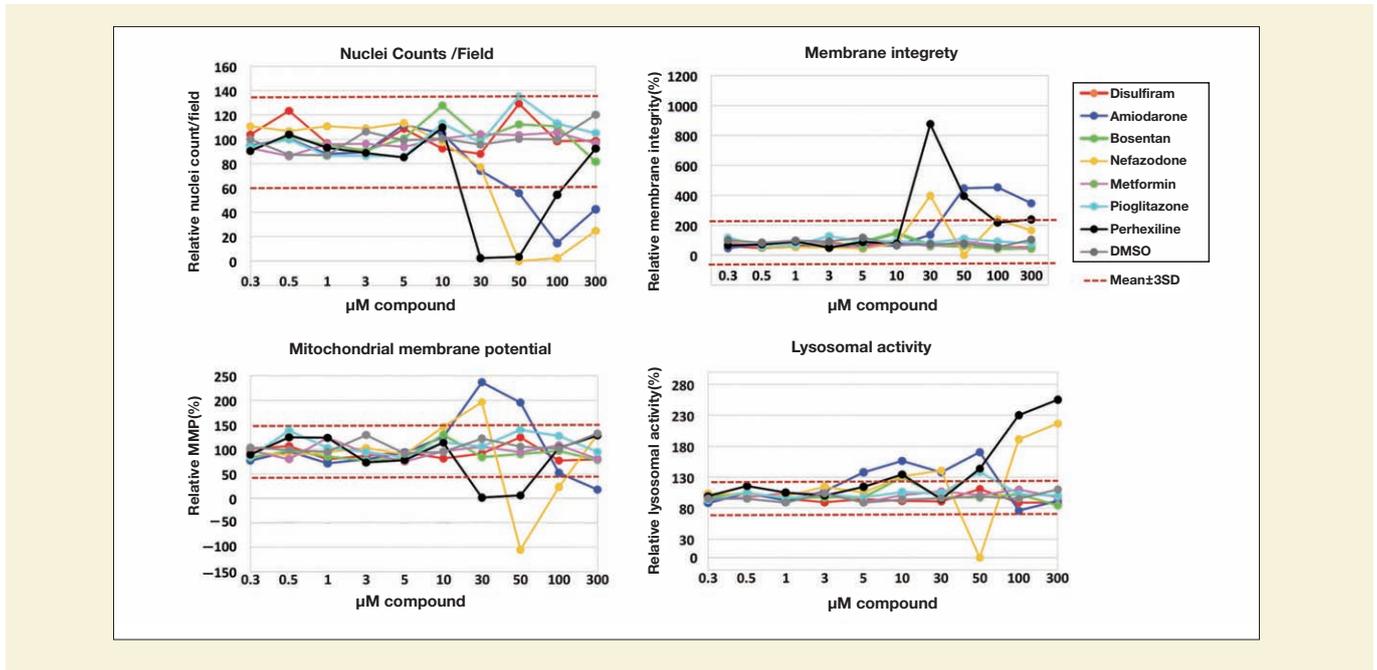


図21. 非肝毒性または肝毒性が知られている化合物7種の曝露24時間後のCellartis Enhanced hiPS-HEPのHCA結果
非肝毒性化合物であるMetformin、Pioglitazone、BosentanはCellartis Enhanced hiPS-HEPで毒性を示さなかった。一方、肝毒性のAmiodarone、Nefazodone、およびPerhexilineは予測通りミトコンドリア膜電位に変化を与えた。Perhexilineは濃度依存的にリソソーム活性の増大を誘導した。Nefazodoneは50 μM以上で沈殿粒子が認められたが、更に濃度が高くなると再び濃度依存的な影響が観察されるようになった。Disulfiramはヒト初代肝細胞(PHH)で低毒性、HepG2細胞株では高毒性を示す薬物だが、Cellartis Enhanced hiPS-HEPに対してはPHHと同様の低毒性を示した。

結論

Cellartis® Enhanced hiPS-HEPは、イメージングを基にしたHCA法や、既知の肝毒性化合物への反応性確認、創薬初期の*in vitro*での細胞毒性スクリーニングで頻繁に実施されるエンドポイント測定法に適していることが示されました。