

第48回WAKO Web受託セミナー

『細胞3次元モデルについて: Primary細胞～3D臓器モデル』



株式会社サイフューズ

ヒト3Dミニ肝臓の使い方 ～薬剤性肝障害評価のヒント～

2023年 11月

研究開発部 前川敏彦

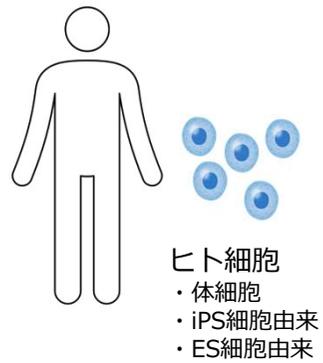
Agenda

- I 機能性細胞デバイス～ヒト3Dミニ肝臓の概要
- II 低分子医薬品の薬剤性肝障害評価
- III Newモダリティーの肝障害評価
- IV 今後の展開

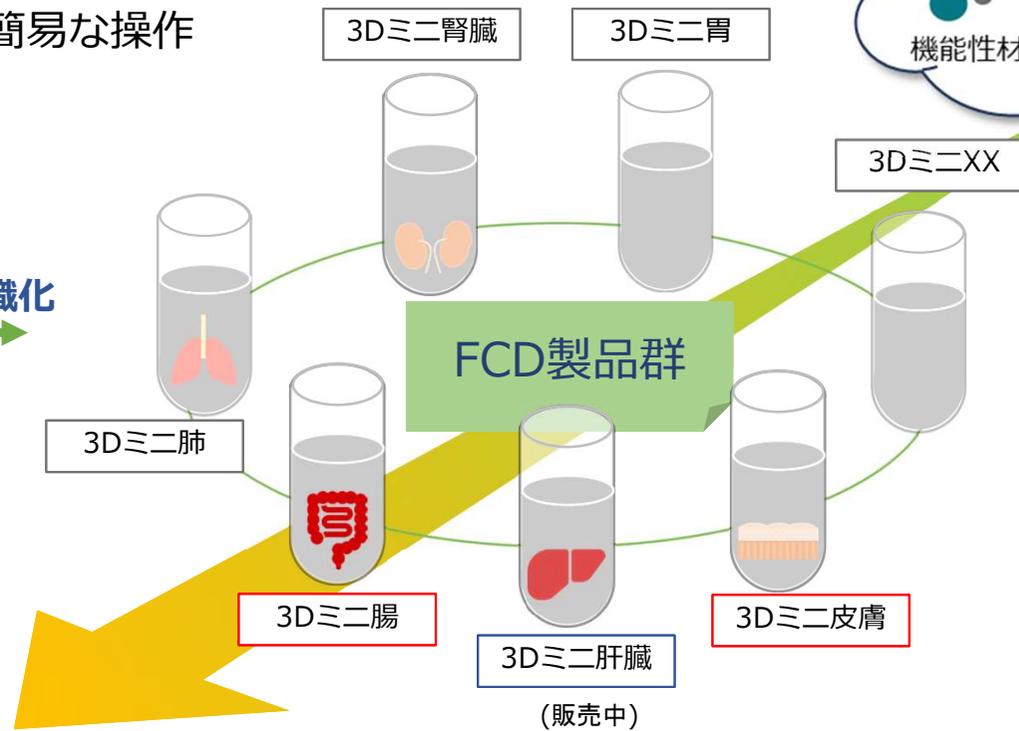
I. 機能性細胞デバイス～ヒト3Dミニ肝臓の概要

機能性細胞デバイス *Functional Cellular Device* ; FCD

- ・ヒト臓器機能の一部を体外で再現したデバイス
- ・特徴；高い再現性、均一な品質、簡易な操作



3次元組織化

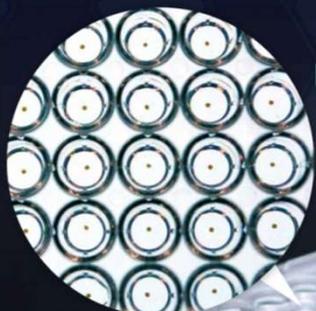


ヒト体内挙動の予測

- ・有効性／安全性
- ・作用機構解明

ヒト3Dミニ肝臓 (FCD1001)

サイフューズの「バイオ3Dプリンティング技術」と大阪サニタリーの「無剪断攪拌技術」によって
生み出された新製品「3Dミニ肝臓」は、
ヒトの肝臓機能を再現した画期的なin vitro評価ツールです。



ヒト3Dミニ肝臓の特徴

- FEATURE 01 ヒト肝臓由来細胞
- FEATURE 02 長期アッセイに対応
- FEATURE 03 高い薬物代謝機能
- FEATURE 04 容易な取り扱い性

肝実質細胞
肝星細胞

約1ヶ月

使用用途



薬物の
長期肝毒性評価

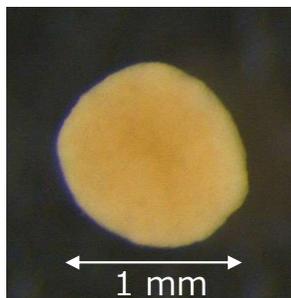


薬物の
代謝経路解析

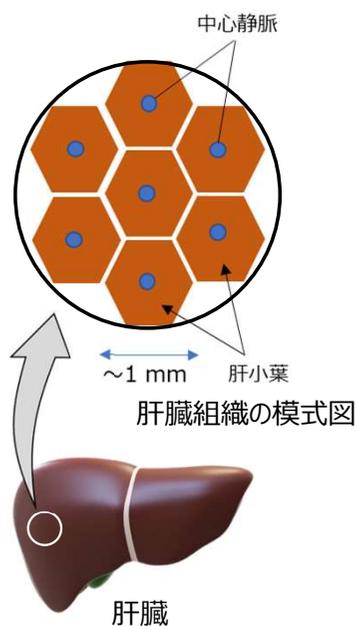


代謝安定性の
高い薬物の評価

3Dミニ肝臓の特徴



3次元ヒト培養肝臓組織の外観



■ 健全なヒト肝臓の薬物代謝機能を再現した肝臓モデル

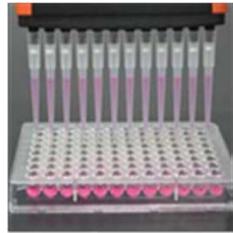
- 1. 約 1 mm の球状体 (肝小葉同等のサイズ)
- 2. ヒト肝臓の細胞のみで構成 ; 肝実質細胞と肝星細胞
- 3. 1ヶ月の長期培養が可能
- 4. ヒト肝臓に類似の代謝機能
- 5. 薬物投与に応答してエクソソームやマイクロRNAを分泌
- 6. 96ウェルプレートに1個/ウェル配置した製品

■ *in vitro* 評価系への応用

- 薬物誘導性肝障害 (毒性)
 - ・ 既存評価系では難しかった化合物の肝毒性の検出
 - ・ Newモダリティーでの新薬開発における肝毒性の評価
- 肝線維化の評価モデル作製 (有効性)

3Dミニ肝臓製造フロー

◆ヒト肝細胞



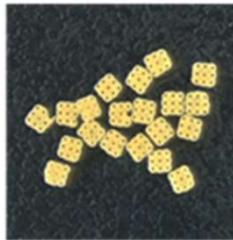
プレート播種

◆スフェロイド

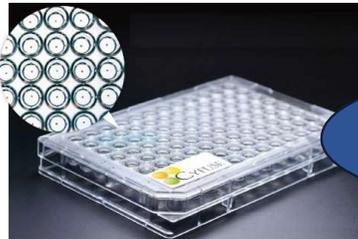


バイオ3Dプリンタ
三次元積層

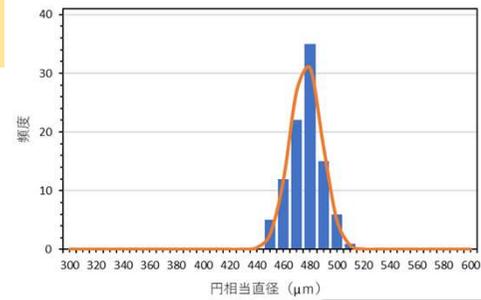
◆3Dミニ肝臓



◆パッケージ化



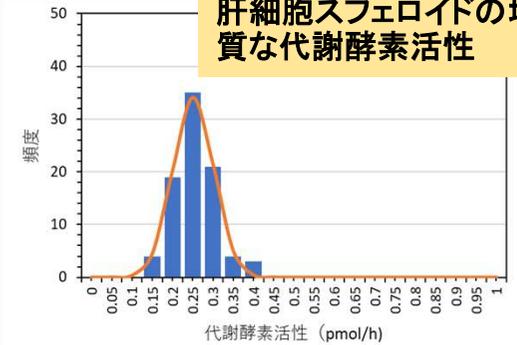
粒子径の揃った
肝細胞スフェロイド



ヒト肝臓
由来細胞

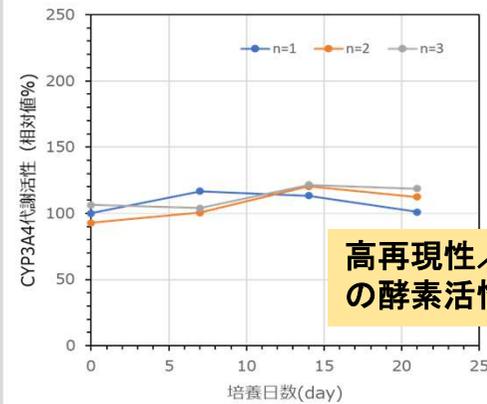
安定な品質

肝細胞スフェロイドの均
質な代謝酵素活性



均質な性能

容易な取り
扱い性



高再現性／小変動
の酵素活性

均質な代謝酵素活性を実現

3Dミニ肝臓、組織のサイズ

(小)

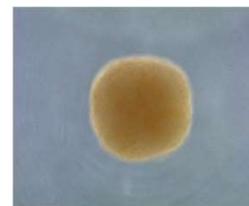
(大)



$\phi = 480 \mu\text{m}$



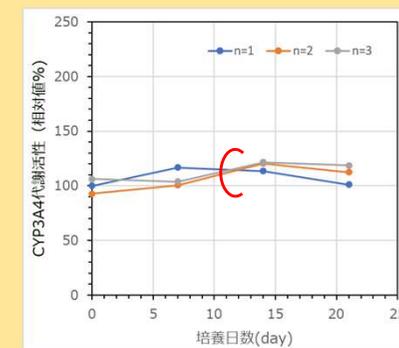
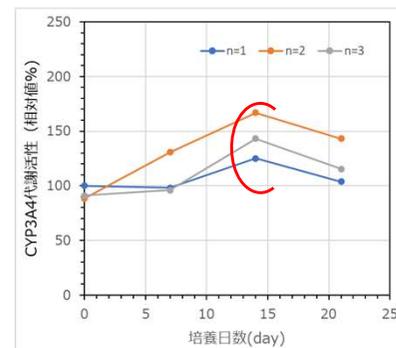
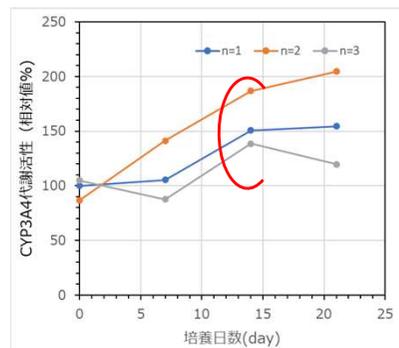
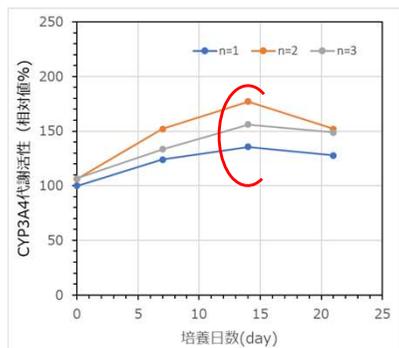
$\phi = 900 \mu\text{m}$



$\phi = 1,050 \mu\text{m}$



$\phi = 1,200 \mu\text{m}$



(大)

代謝酵素活性の変動、ばらつき

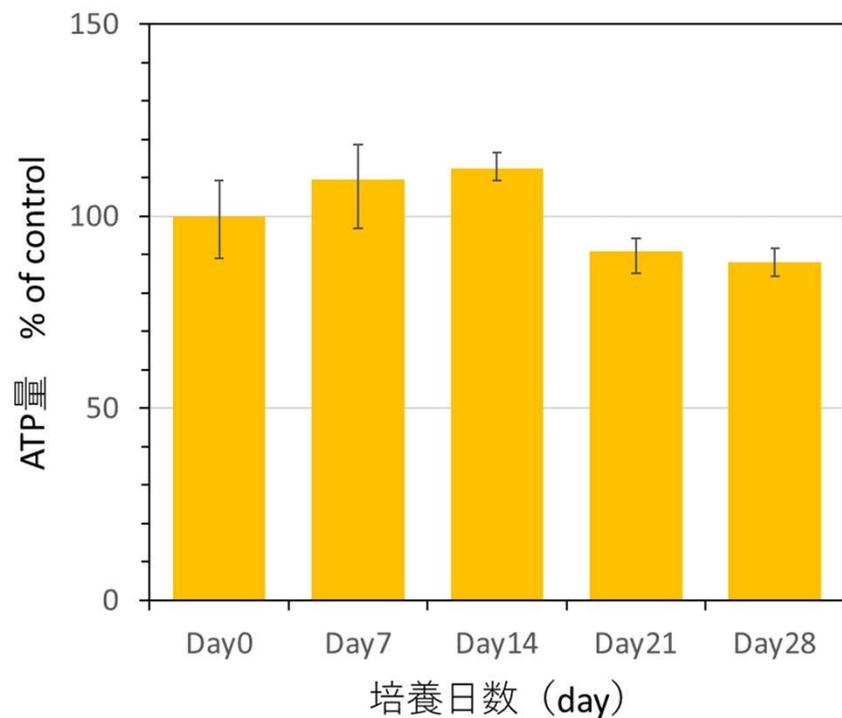
(小)



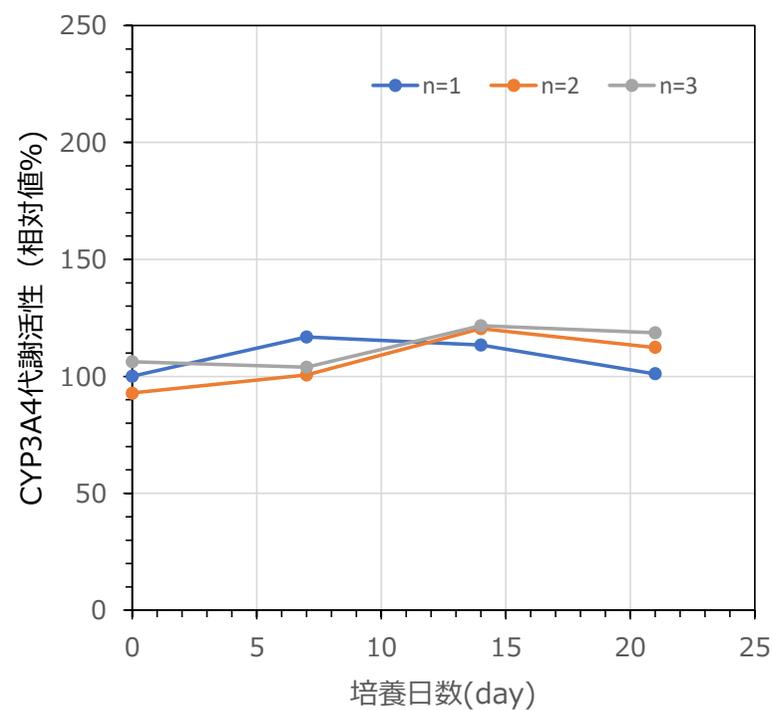
長期間安定な生存率と代謝酵素活性

- 約1ヶ月間の安定な培養が可能な直径1 mmの組織
- 安定な代謝酵素活性を示し、ばらつきの少ない評価系を構築できる

1ヶ月間の生存率90%以上



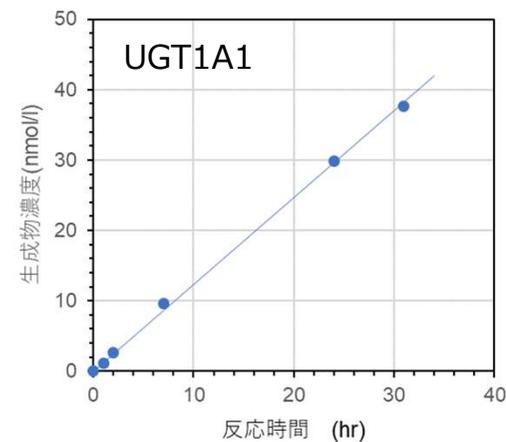
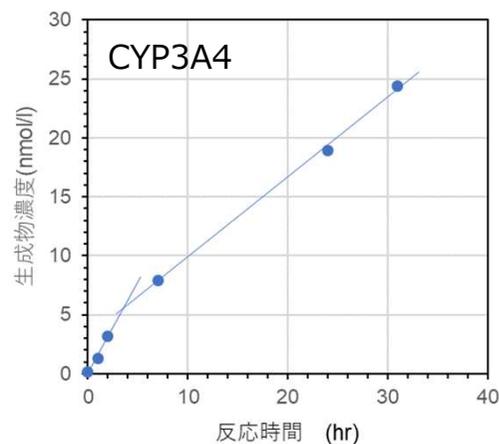
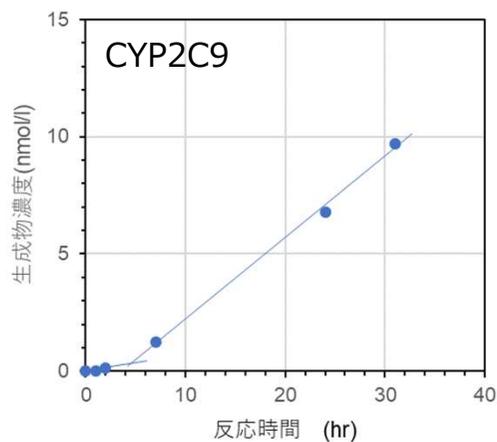
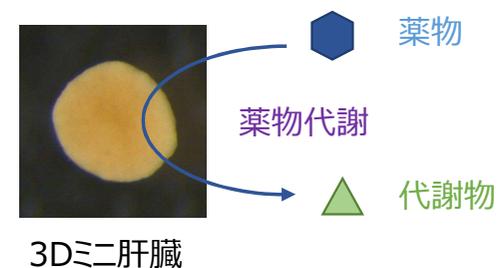
再現性の高い酵素活性



3Dミニ肝臓の代謝活性

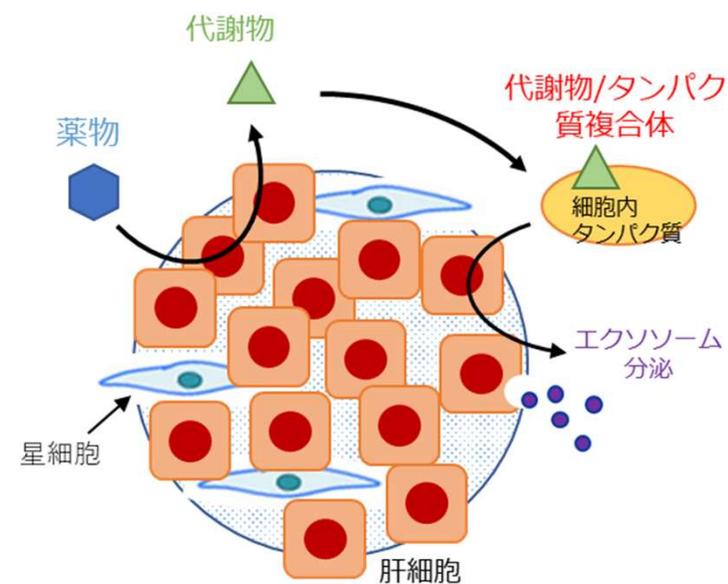
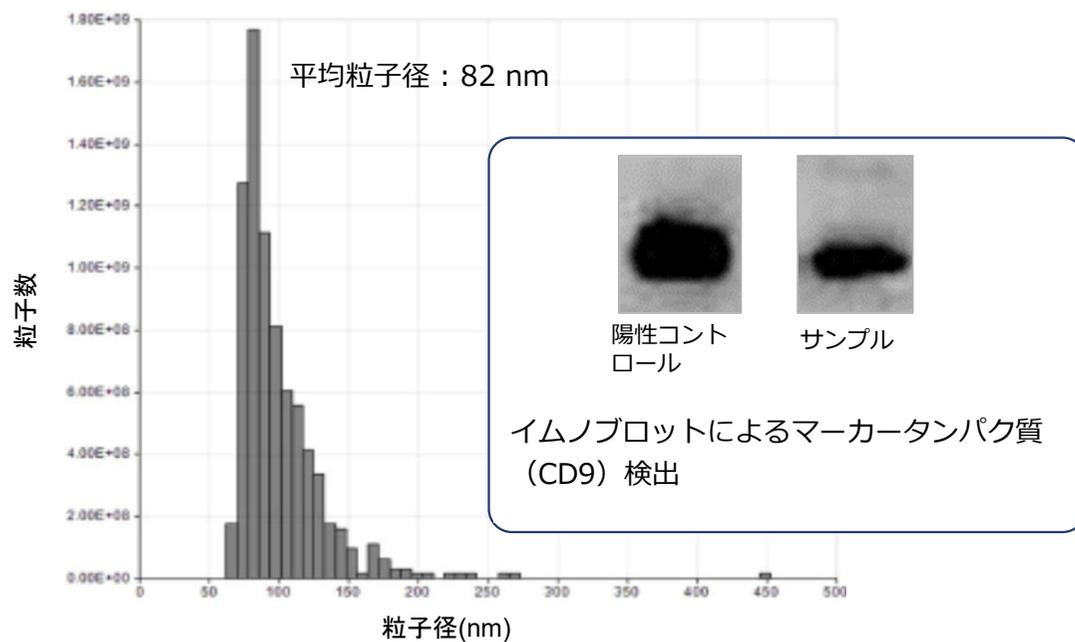
- 4種の基質を培養液に添加
- 培養上清中の反応生成物濃度を定量 (LC/MS/MSで定量)

酵素	基質	生成物
CYP2C9	Diclofenac	4'-Hydroxydiclofenac
CYP2C19	S-Mephenytoin	4'-Hydroxymephenytoin
CYP3A4	Midazolam	1'-Hydroxymidazolam
UGT1A1	Naloxone	Naloxone-3-Glucuronide

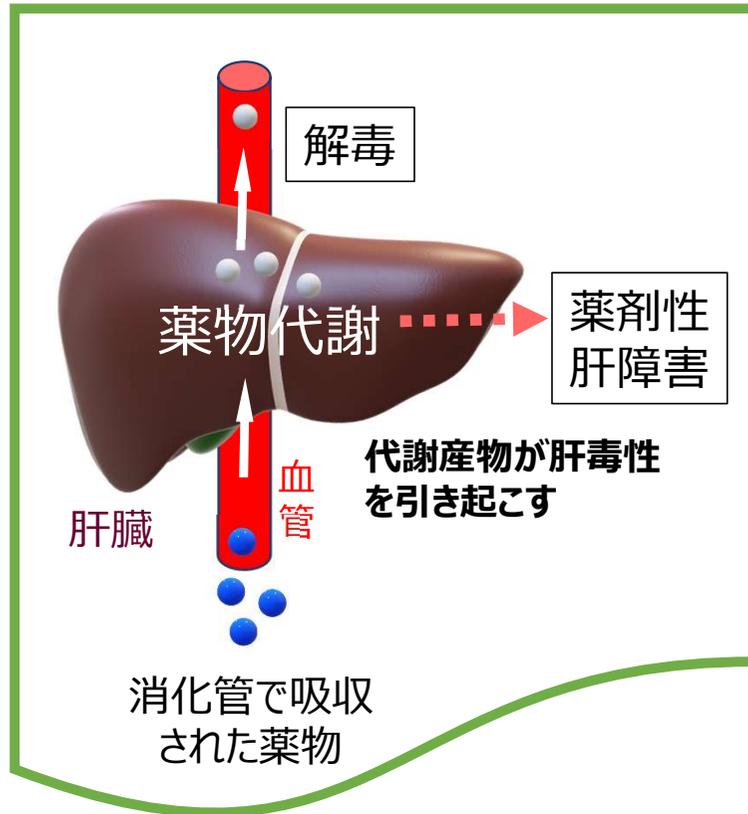


薬物投与にตอบสนองしてエクソソームを分泌する

- 3Dミニ肝臓の培養培地に薬物を添加、数日後に培地上清からエクソソームを回収。
(粒子径~80 nm、CD9陽性)
- 生体内の肝臓と同じく、3Dミニ肝臓はエクソソームを分泌する。

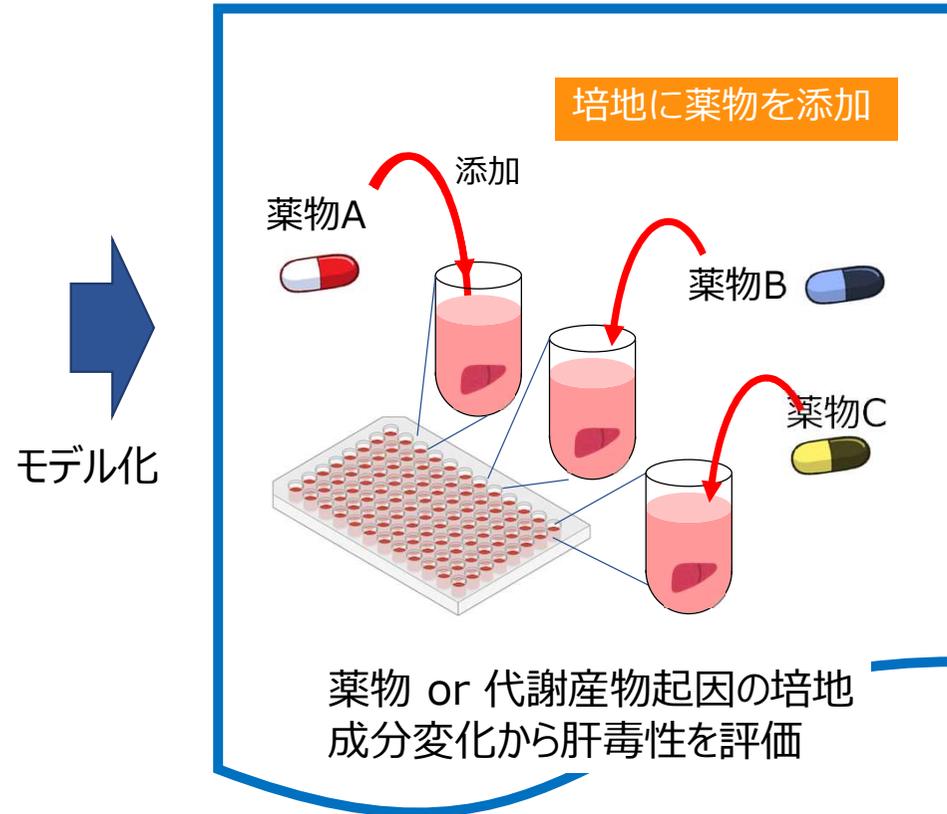


II. 低分子医薬品の薬剤性肝障害評価



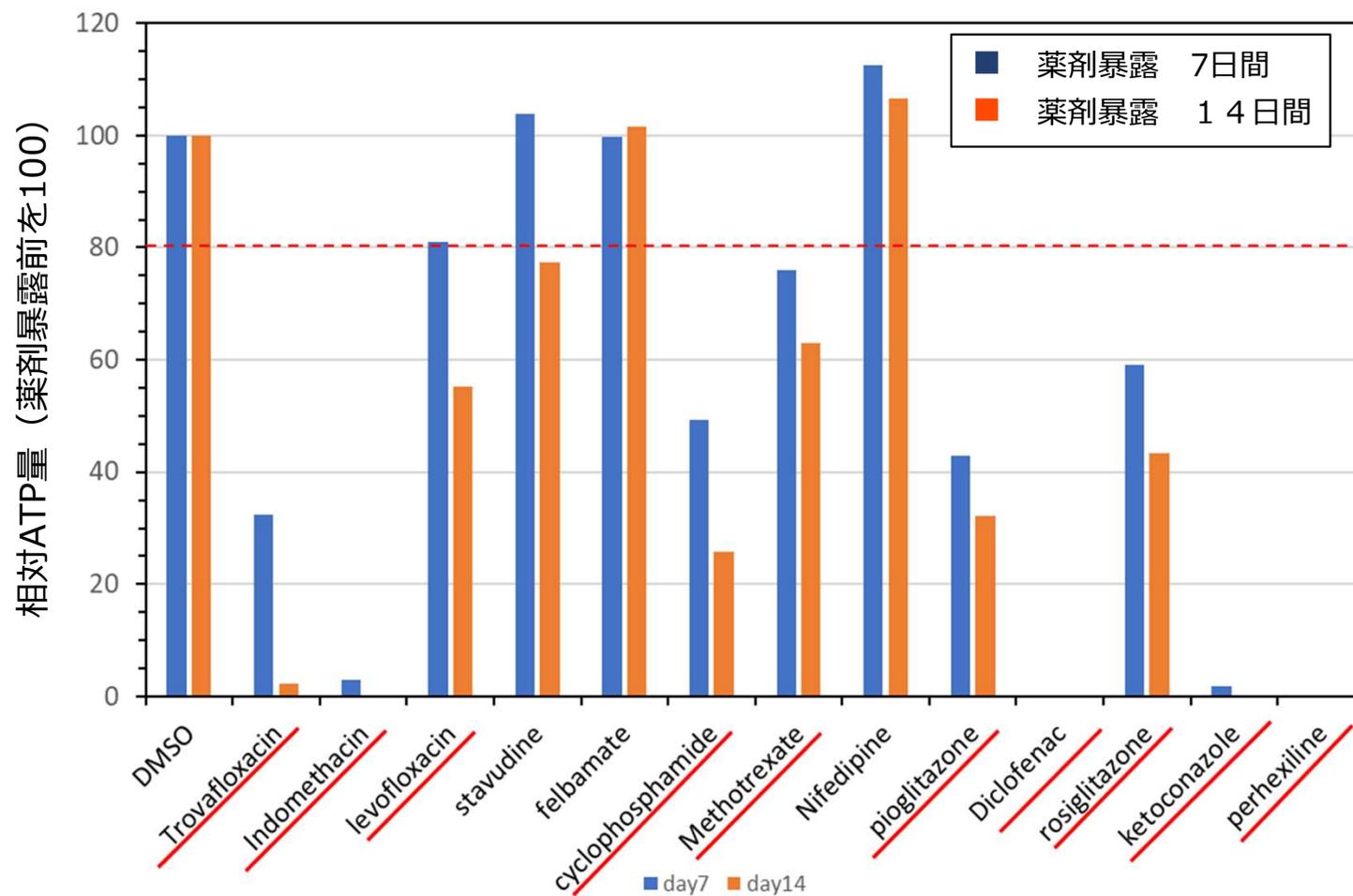
ヒト肝臓での薬物代謝と毒性

ヒト肝臓の薬物代謝機能を再現した3Dミニ肝臓



3Dミニ肝臓を用いた肝毒性評価系

ATPを指標とした肝毒性評価



3 Dミニ肝臓の肝毒性検出能力

～ 粒径の小さい(200 μm)スフェロイドとの比較

Category: Withdrawn 5/5

化合物名	This Study		比較※
	判定	生存率(%)	
benoxaprofen	posi	21	nega
glafemine	posi	73	nega
perhexiline	posi	0	posi
troglitazone	posi	0	posi
trovafloxacin	posi	2	-

Category: Box Warning 2/2

化合物名	This Study		比較※
	判定	生存率(%)	
ketoconazole	posi	0	posi
methotrexate	posi	63	posi

※比較

小サイズスフェロイドによる評価

TOXICOLOGICAL SCIENCE, 163(2),2018,655-663

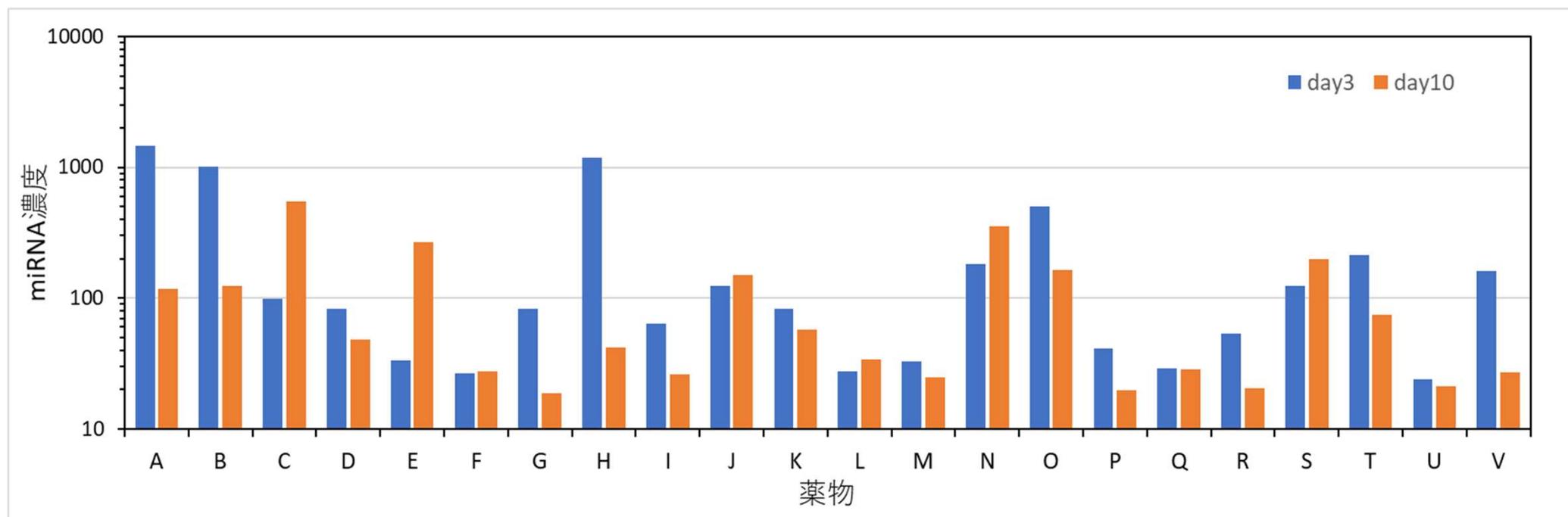
Category: Warning & precautions or Adverse reactions 8/10

化合物名	This Study		比較※
	判定	生存率(%)	
acetaminophen	posi	35	posi
albendazole	posi	33	nega
diclofenac	posi	0	posi
disulfiram	posi	68	posi
fenofibrate	posi	74	posi

化合物名	This Study		比較※
	判定	生存率(%)	
fluconazole	posi	80	nega
labetalol	posi	57	nega
zileuton	posi	0	nega
grisofulvin	nega	99	nega
imipramine	nega	91	posi

エクソソーム中のmiRNA量が薬物種に応答

- ・薬物添加した培地から回収したエクソソーム中からはマイクロRNAを検出
- ・特定のmiRNA(miR-122-5p)は、添加薬物種に応じて濃度が約2桁変動

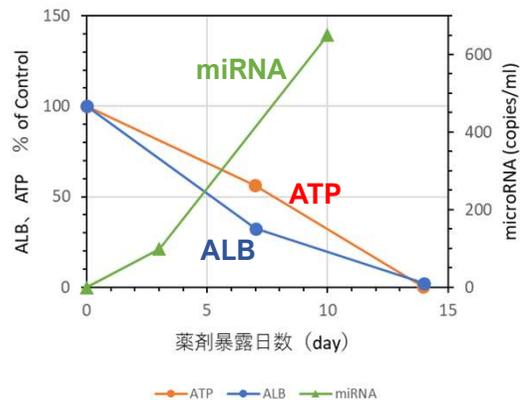
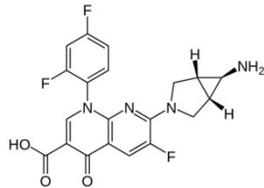


miRNA分泌量を用いた薬物毒性の評価

trovafloxacin

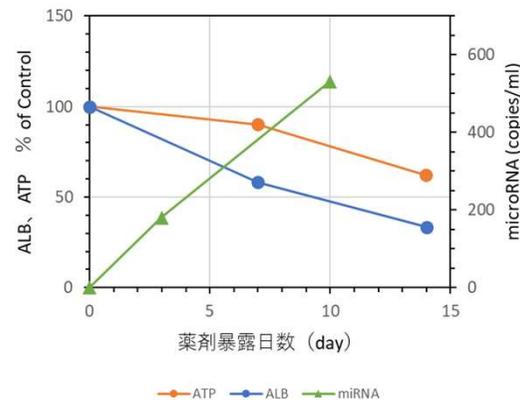
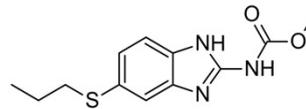
FDA
安全性

Withdrawn



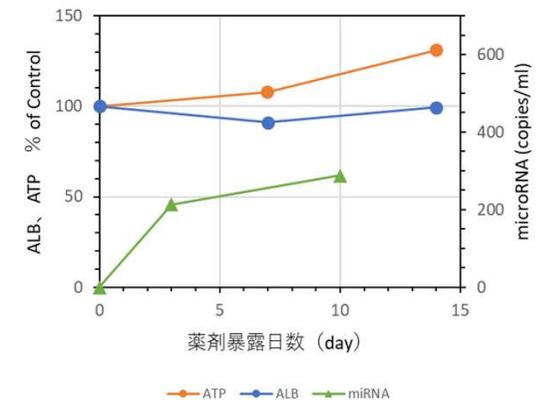
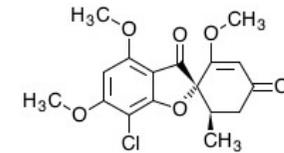
albendazole

Warning & precautions



grisofulvin

Warning & precautions

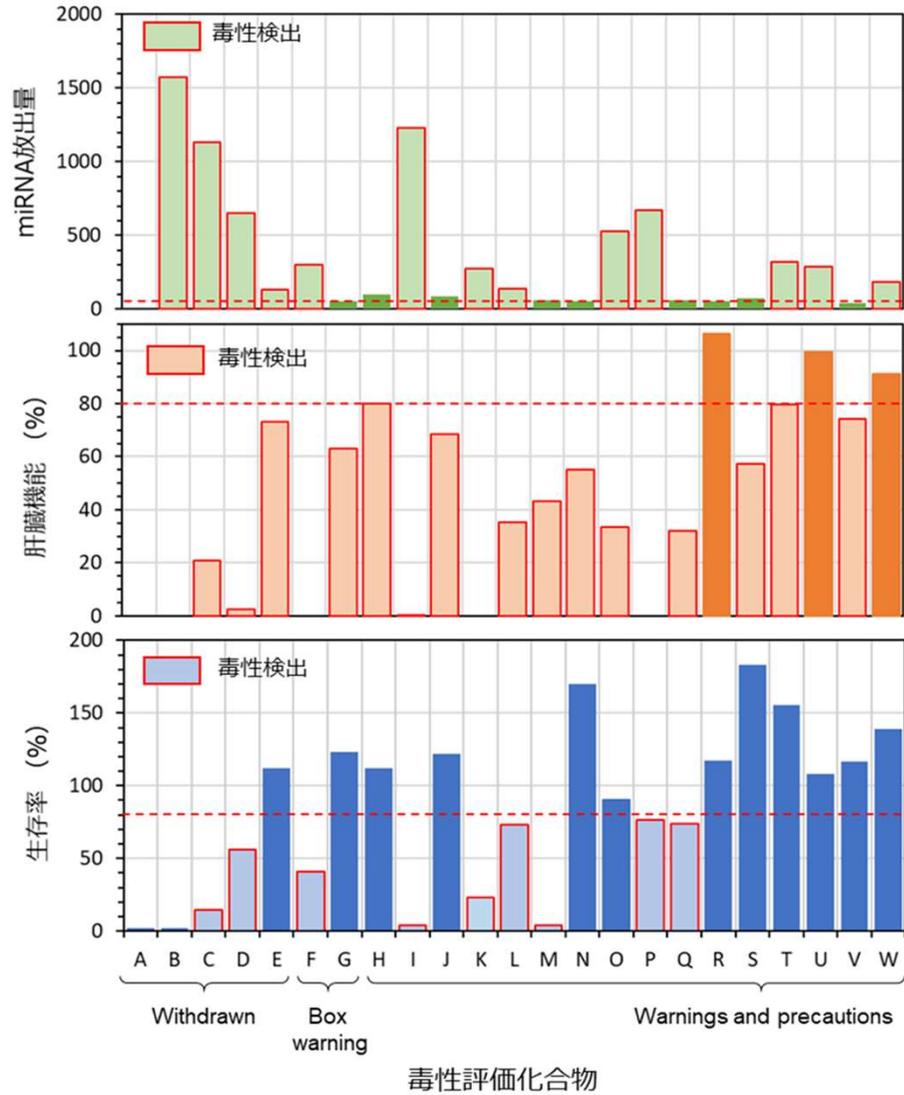
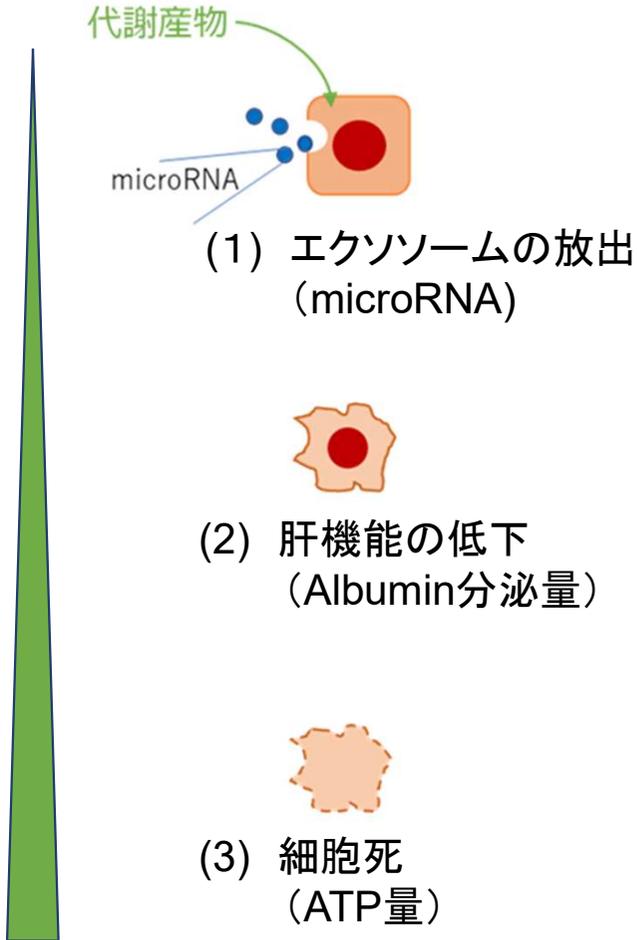


- ATP : 肝細胞の生存率、● ALB : アルブミン分泌機能、● miRNA : miR122-5 p

3つの指標を用いることで肝細胞に与える影響を高感度に検知

薬剤暴露に応じた3Dミニ肝臓の応答

細胞へのダメージ



多指標検出による高感度な肝毒性評価システム

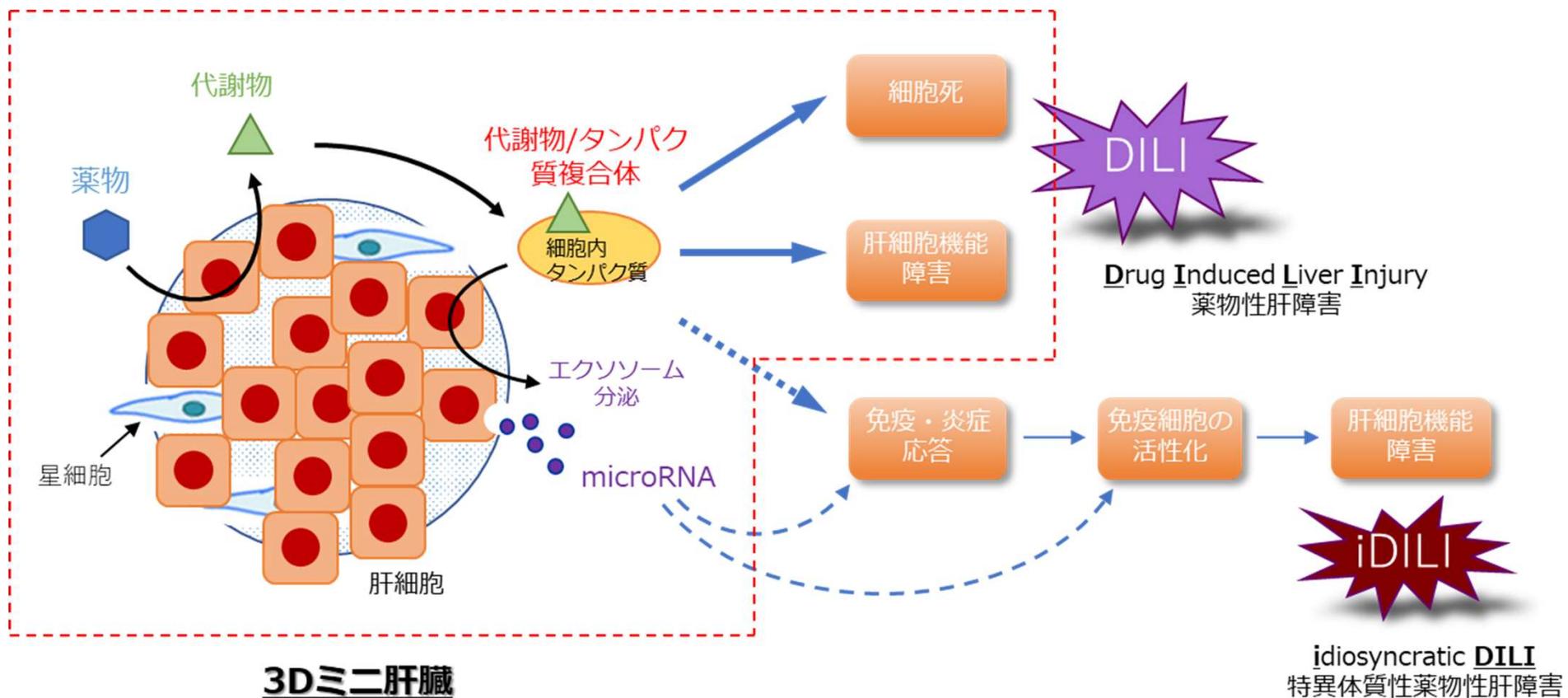
	FDA 安全性ラベル	化合物名	micro RNA	肝臓 機能	生存 率	総合 判定	比較
A	Withdrawing	perhexiline		+	+	■	■
B		troglitazone	+	+	+	■	▲
C		benoxaprofen	+	+	+	■	▲
D		trovafloxacin	+	+	+	■	▲
E		glafenine	+	+	-	■	■
F	Box warning	ketoconazole	+	+	+	■	■
G		methotrexate	-	+	-	■	■
H	Warnings and precautions	clomipramine	-	+	-	■	■
I		diclofenac	+	+	+	■	■
J		disulfiram	-	+	-	■	■
K		indomethacin	+	+	+	■	■
L		acetaminophen	+	+	+	■	■
M		rosiglitazone	-	+	+	■	▲
N		levofloxacin	-	+	-	■	▲
O		albendazole	+	+	-	■	▲
P		zileuton	+	+	+	■	▲
Q		pioglitazone	-	+	+	■	▲
R		nifedipine	-	-	-	▲	▲
S	labetalol	-	+	-	■	▲	
T	fluconazole	+	+	-	■	▲	
U	griseofulvin	+	-	-	■	▲	
V	fenofibrate	-	+	-	■	■	
W	Adverse reactions	imipramine	+	-	-	■	■

- 危険性高い薬剤(薬物B~D)
3種のマーカーでいずれも検出
- 危険性中程度の薬剤(薬物F~V)
3種のマーカーのうち少なくとも1種で検出
- 総合判定
23薬物中22薬物の毒性を検出。

+ ; 検出
- ; 検出なし

■ ; 毒性予測可能
▲ ; 毒性予測不可能

3Dミニ肝臓による薬剤誘導性肝障害の検出

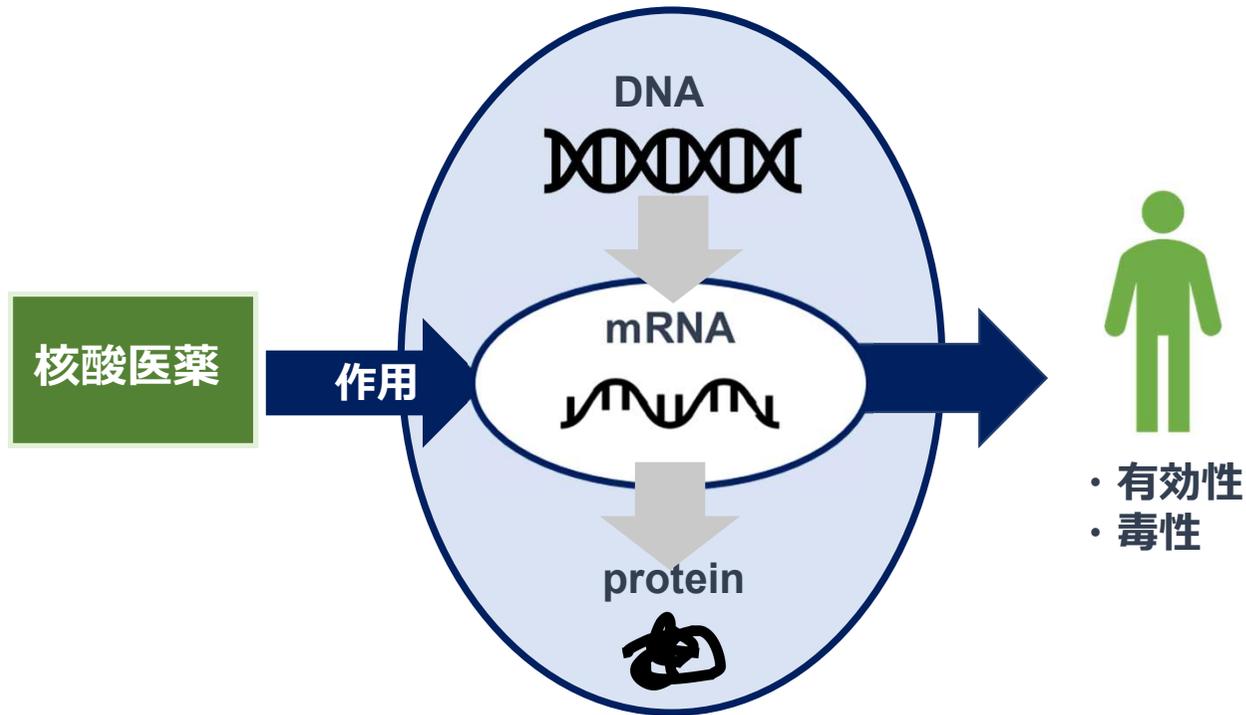


免疫が関与すると言われている肝障害をマイクロRNAの挙動から予測できないか？！

III. Newモダリティーの肝障害評価

核酸医薬

- ・ 難治性疾患に対する新モダリティーとして注目
- ・ ハイブリダイゼーションに起因する肝毒性の懸念



オフターゲット評価法の現状



In Silico



Microarray



Humanized mouse



A quick and easy new method

3D mini-liver



評価した薬剤

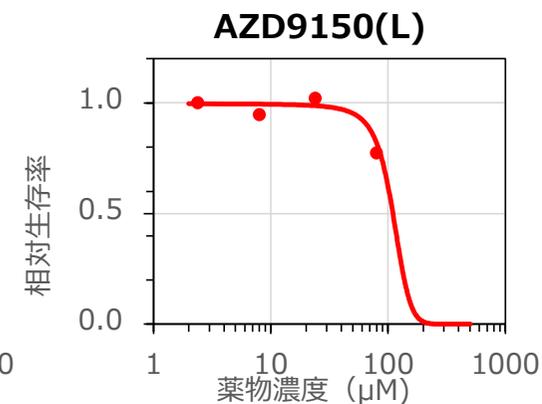
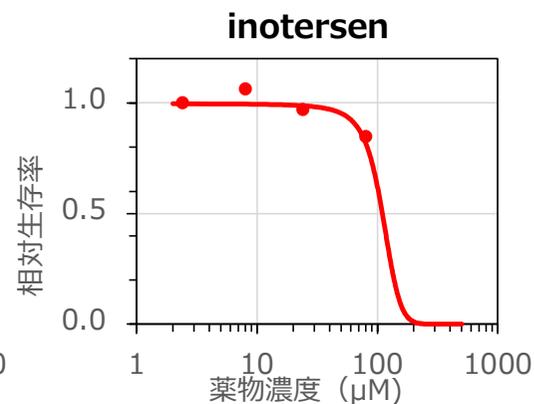
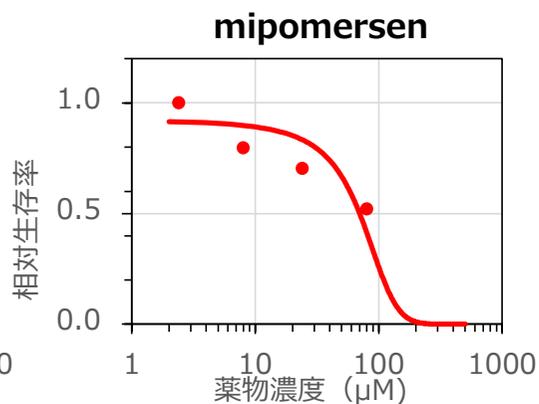
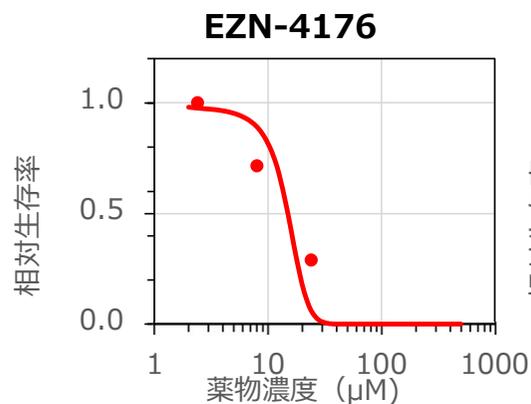
化合物	承認	対象疾患	ターゲット
mipomersen	FDA	ホモ接合型家族性 高コレステロール血症	ApoB-100
inotersen	FDA,EMA	遺伝性ATTR アミロイドーシス	TTR
AZD9150	phase 2	非小細胞肺癌	STAT
EZN-4176	discontinued	前立腺癌	AR

EZN-4176

動物での評価 : マウスに60 mg/kg投与の結果、腫瘍拡大抑制効果、ALT上昇は観測されず

ヒトでの評価 : 10 mg/kg投与でALT/ASTが40%上昇。試験中止

ATP量を指標とした肝毒性評価



IC ₅₀ (μM)	18	80	110	110
生存率への影響	+++	++	+	+

肝毒性の序列 EZN-4176 > Mipomersen > Inotersen、AZD9150(L)

形態変化
光学顕微鏡像



肝毒性評価のまとめ

Compound	ATP IC ₅₀ (μ M)	肝機能 (Albmin分泌量)	3Dミニ肝臓への 影響 総合評価	臨床データ ALT上昇
EZN-4176	18	+++	High	Grade 3: 67%
mipomersen	80	++	middle	Grade 2: 39%
inotersen	>100	+	Low	Grade 2: 8%
AZD9150(L)	>100	+	Low	Grade 2: 24%

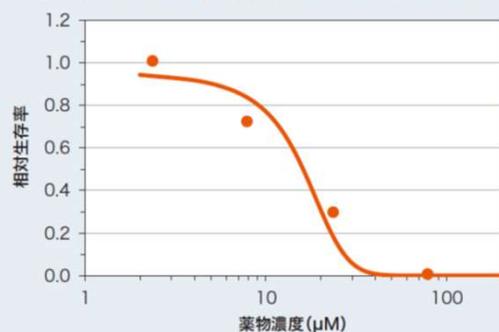
ヒト臨床での肝毒性とおおよそ対応する評価結果を得た

薬物毒性評価の事例

ヒト3Dミニ肝臓の毒性評価

核酸医薬の評価例

アンチセンス核酸の濃度依存的な生存率の低下から毒性の程度が推測できました



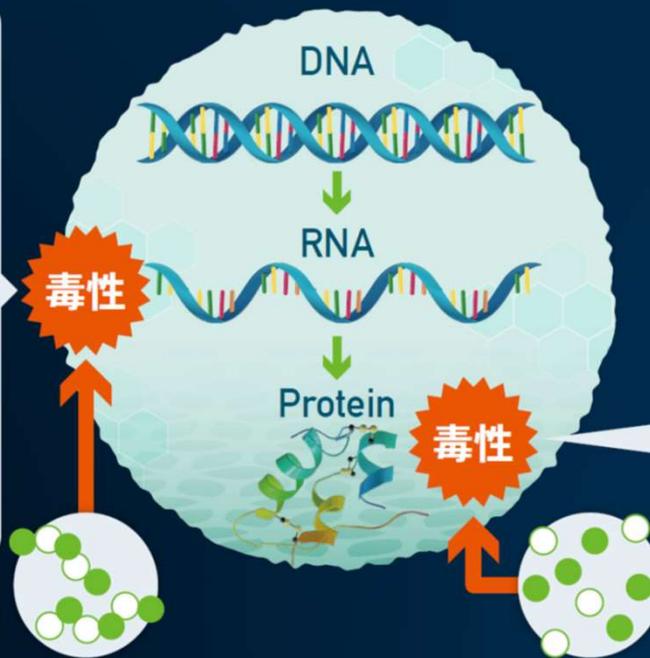
中分子医薬 (核酸医薬)

低分子医薬の評価例

低分子薬への2週間連続暴露の結果から、毒性発現の可能性を高感度に評価できました

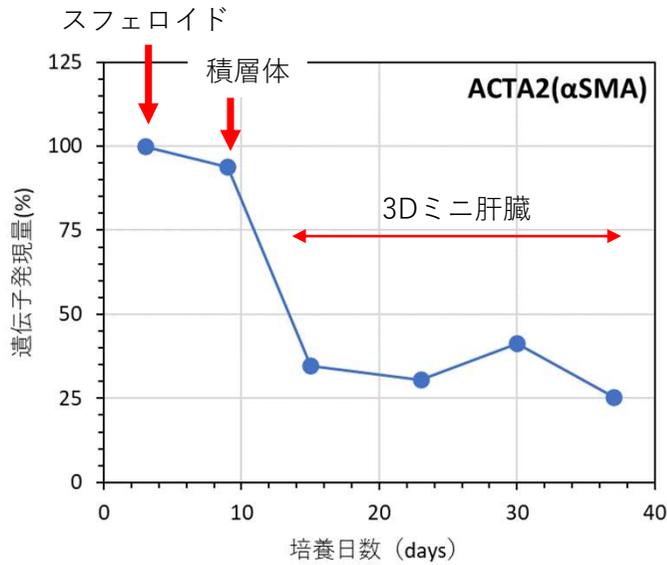


低分子医薬

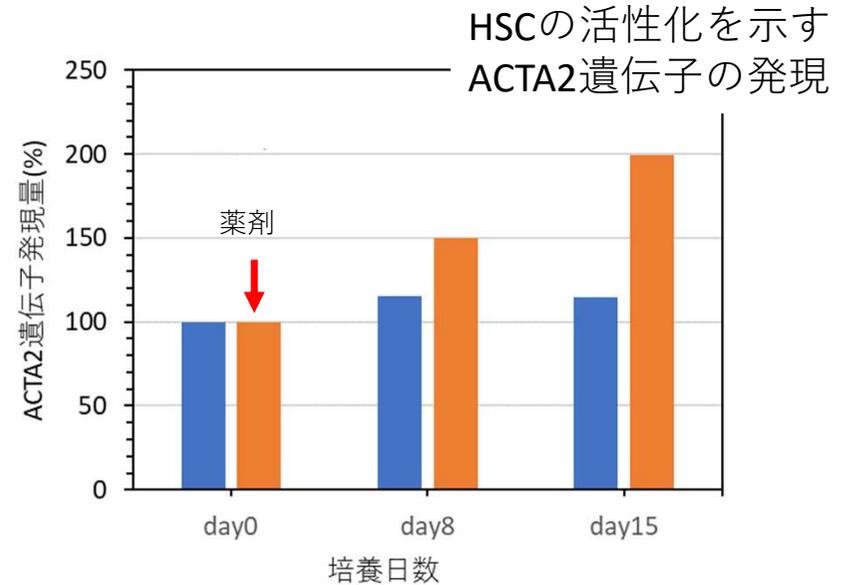


IV. 今後の展望

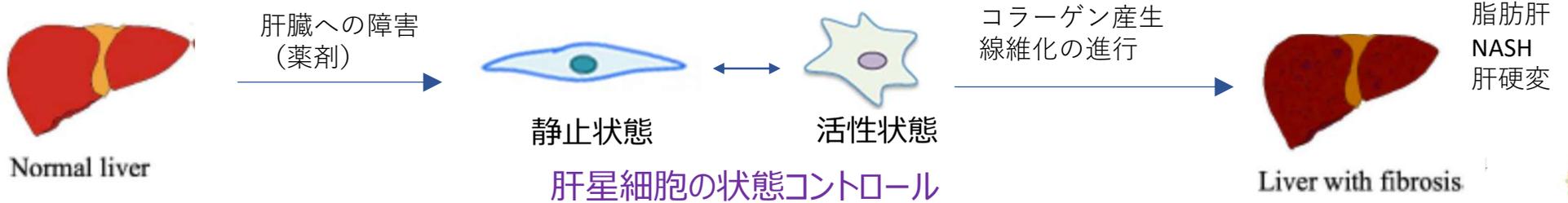
健全な肝臓から疾患肝臓を作る



HSC : 静止状態



HSC : 活性状態





Create hope
from cells.

細胞から希望をつくる。

ご清聴ありがとうございました

Info.jp@cyfusebm.com