

創薬研究用ヒト腎細胞 3D-RPTEC® の細胞性状紹介

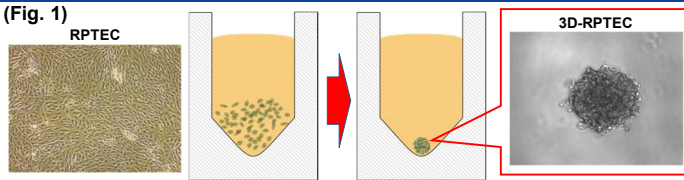
NIKKISO

概要

創薬研究において、候補化合物の毒性により開発中止となるケースは非常に多い。特に、開発後期段階での毒性発現は研究費と時間の多大な損失に直結するため、開発初期段階で効率よく候補化合物の毒性を評価し、毒性のない化合物を特定することが重要となる。腎臓は薬物による毒性を示しやすい臓器として知られており、候補化合物による腎障害の程度を正確に把握することは、毒性評価において非常に重要である。3D-RPTEC はヒト初代近位尿管上皮細胞 (RPTEC; Renal Proximal Tubule Epithelial Cells) を 3 次元で培養したスフェロイドであり、従来の 2 次元培養した RPTEC や腎臓由来株細胞よりもヒト生体腎皮質に近い薬物トランスポーター発現を示す。従って、3D-RPTEC は従来の腎細胞よりも薬物応答性が向上し、*in vitro* でより感度の高い毒性評価を簡便に行うことができる。

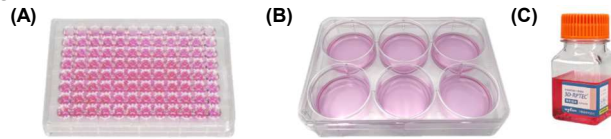
3D-RPTEC の製品プロフィール

(Fig. 1)



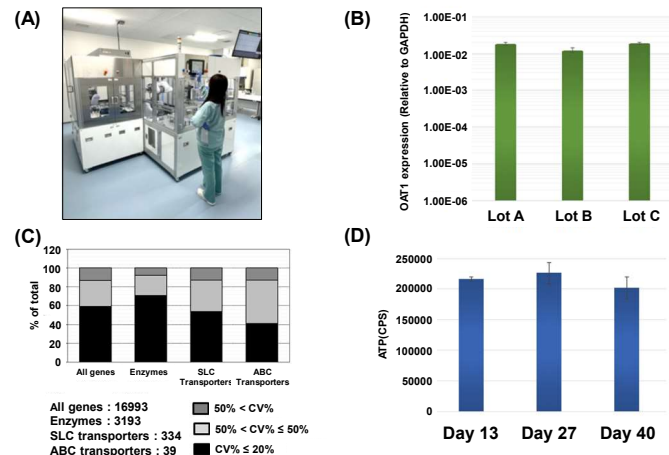
(Fig. 1) 初代近位尿管上皮細胞 (RPTEC) と、3D-RPTEC の明視野画像。RPTEC (LONZA 製) を平面培養した後、低接着性 96 well 培養プレート内で凝集体 (3D-RPTEC) を作製した。

(Fig. 2)



(Fig. 2A) 3D-RPTEC (96well-Single)。各ウェルに 1 個のスフェロイドが入っており、薬理評価や毒性評価に適している。(Fig. 2B) 3D-RPTEC (6well-Multi)。各ウェルに約 500 個のスフェロイドが入っており、ウェスタンブロットや分散してトランスウェルへ再播種など、細胞が大量に必要なアッセイに適している。96well-Single、6well-Multiともに常温輸送され、到着翌日からアッセイが可能な「Ready-to-Use 品」となっている。(Fig. 2C) 3D-RPTEC 専用培地。培地交換は到着日または到着翌日から開始し、その後 2~3 日に一度の頻度で培地交換を行う。

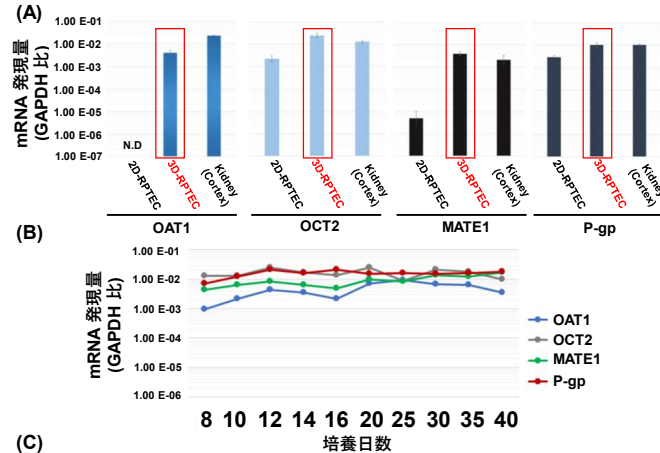
(Fig. 3)



(Fig. 3A) 3D-RPTEC は培地交換や品質確認などの細胞培養～製造までの工程を日機装独自の装置で自動化しており、安定した品質で生産を行うことが可能である。(Fig. 3B) 製造ロット毎の OAT1 / GAPDH 発現比。OAT1 発現 (mRNA) にロット間差が少なく、品質が安定している。(Fig. 3C) マイクロアレイによるドナー間の遺伝子発現解析結果。複数のドナー間でも遺伝子発現に大きな違いが無いことが示されている。(Fig. 3D) 3D-RPTEC の生存率。長期間の培養で生存率が維持しており、長期毒性などの慢性モデルにも利用可能である。

3D-RPTEC の遺伝子発現

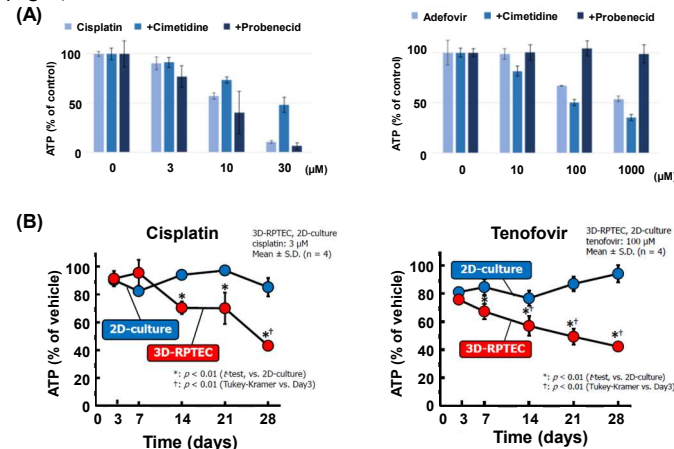
(Fig. 4)



(Fig. 4A) 平面培養した RPTEC (2D-RPTEC)、3D-RPTEC、ヒト腎皮質における OAT1、OCT2、MATE1、P-gp の遺伝子発現比較。2D-RPTEC と比較して、3D-RPTEC は主要な薬物トランスポーターの遺伝子発現が上昇している。(Fig. 4B) 3D-RPTEC における主要な薬物トランスポーター遺伝子発現量の経時的変化。長期間にわたって各遺伝子の発現が維持されている。(Fig. 4C) OAT1、P-gp、SGLT2、Megalin の免疫細胞染色画像。スフェロイド全体に局在する OAT1 と比較して、P-gp および SGLT2 はスフェロイドの外側、Megalin は細胞膜上に局在している。

3D-RPTEC による薬物誘発性腎障害 (DIKI) 評価

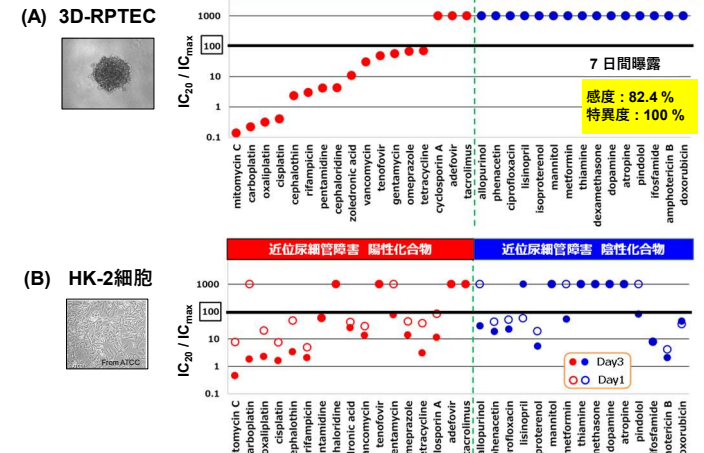
(Fig. 5)



(Fig. 5A) Cisplatin (OCT / MATE 基質) による ATP 量低下は Cimetidine (OCT / MATE 阻害剤) で抑制され、Adefovir (OAT 基質) による ATP 量低下は Probenecid (OAT 阻害剤) で抑制された。Cisplatin と Adefovir が薬物トランスポーターを介した取込みによって細胞毒性を示した。(Fig. 5B) Cisplatin と Tenofovir (OAT 基質) の長期間曝露による細胞内 ATP 量の低下。3D-RPTEC は 2D-RPTEC と比較して細胞内 ATP 量が顕著に減少し、慢性曝露による DIKI 評価も可能であることが示された。

腎毒性の安全性予測

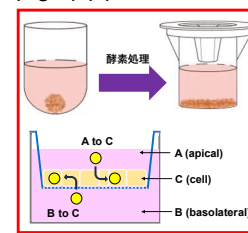
(Fig. 6)



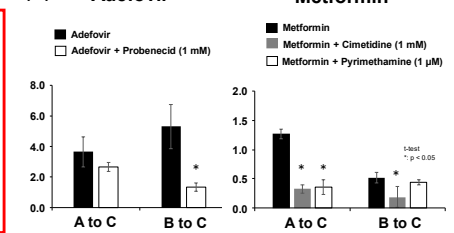
(Fig. 6A) 腎毒性を誘発する多くの薬物で ATP 量の低下を示し、有効濃度と ATP 低下濃度 (IC₂₀ 値) の乖離から安全域を算出した。7 日間曝露において高い感度で腎毒性 (近位尿管障害) を検出した。3D-RPTEC を用いることで、腎毒性薬物のスクリーニングおよび安全性の評価を行うことも可能である。(Fig. 6B) HK-2 細胞では長期曝露で細胞が剥離するため、最長 3 日間で実施した。HK-2 細胞は 3D-RPTEC と比較して偽陽性や偽陰性の薬物が多かった。

3D-RPTEC による薬物動態評価

(Fig. 7) (A)



(B) Adefovir



(Fig. 7A) 薬物取込み (A to C、B to C) 試験。Adefovir では B to C の取込みが Probenecid で阻害された。Metformin では A to C の取込みが Cimetidine (OCT / MATE 阻害剤) および Pyrimethamine (MATE 阻害剤) で阻害され、B to C の取込みが Cimetidine でのみ阻害された。3D-RPTEC の再播種では薬物トランスポーターを介した薬物取込みが示された。

まとめ

- 3D-RPTEC は初代近位尿管上皮細胞をスフェロイド状に 3D 培養した細胞であり、2D-RPTEC よりもヒト生体腎臓に近い遺伝子発現をロット間にわたり安定して示す。
- Cisplatin、Adefovir をはじめとした腎毒性を示す多くの薬物で、3D-RPTEC は ATP 量の低下を示した。
- 3D-RPTEC を分散しトランスウェル上に再播種することで、薬物取込み能評価を行うことができる。

Wako

3D-RPTEC を皆様の研究にご活用いただけると幸いです。

3D-RPTEC のお見積りはこちら→

販売元：富士フイルム和光純薬株式会社

