

最もヒト初代肝細胞に近いセルライン



Biopredic

• H • E • P • A <sup>RG</sup> •

# HepaRG<sup>®</sup>

THE HEPATIC STEM CELL LINE

HepaRG<sup>®</sup>専用 web site

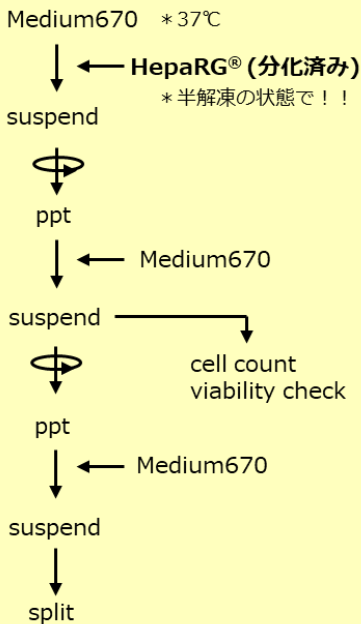
<http://www.heparg.com>



HepaRG<sup>®</sup>はフランスINSERM（国立医学研究所）で開発されたヒト肝細胞セルラインです。肝細胞様形態を呈し、各種肝機能を保持・発現しており、ヒト初代肝細胞の代替ツールとして薬物動態および毒性試験などに広く利用されています。ロット間差が少なく、創薬の初期段階の評価に適しています。

- ✓ 凍結バイアルでのお届けなのでご希望のタイミングで使用可能です
- ✓ 標準操作手順書をご用意しております

### 【融解・播種】



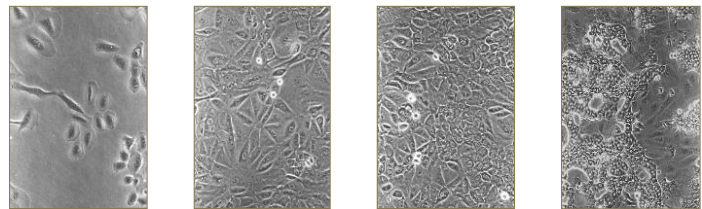
### HepaRG<sup>®</sup>の増殖分化経過

Philippe Gripon, et al.  
PNAS. 99 (24), 15655-15660 (2002)

増殖

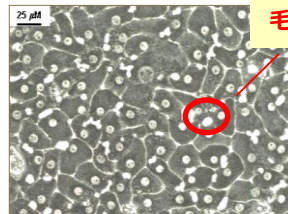
分化

→ + DMSO



### ヒト初代培養肝細胞

### 分化済 HepaRG<sup>®</sup>



毛細胆管構造



二核細胞



陽助手

HepaRG<sup>®</sup>はヒト肝細胞のモデルとして *in vitro* で手軽に評価できる優れた細胞なんです！是非僕も使ってみたいです、教授！！  
使用上の注意点があれば、教えてくださいませんか？

HepaRG<sup>®</sup>はLimited Use Licenceの製品なんじゃ。使い切りでの使用を前提に販売されておるから、増殖やクローニング、サブクローニング等が禁止されておる。もしそういった使い方を希望する場合は別途契約が必要じゃから、ケー・イー・シーに相談してみると良いぞ。



パイ博士



Biopredic  
INTERNATIONAL  
• H • E • P • A R G ®

最もヒト初代肝細胞に近いセルライン

HepaRG®

THE HEPATIC STEM CELL LINE



HepaRG®専用 web site

<http://www.heparg.com>

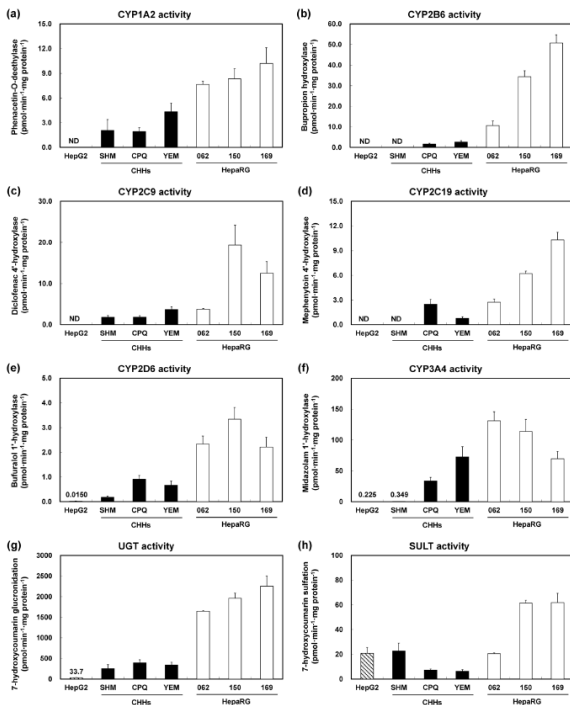
HepaRG®はフランスINSERM（国立医学研究所）で開発されたヒト肝細胞セルラインです。肝細胞様形態を呈し、各種肝機能を保持・発現しており、ヒト初代肝細胞の代替ツールとして薬物動態および毒性試験などに広く利用されています。ロット間差が少なく、創薬の初期段階の評価に適しています。

【代謝試験】



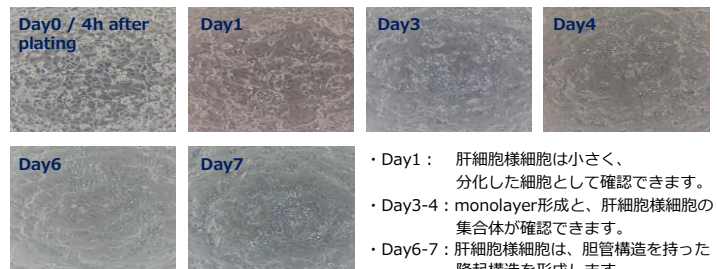
薬物代謝はPhase I (チトクロムP450s (CYPs)による酸化反応)とPhase II (UGT、SULT、GST等による抱合反応)に大別されており、薬物の消失に重要な役割を果たしています。薬物動態学的な相互作用の多くはCYPs活性阻害によって引き起こされるため、*in vitro*の代謝阻害試験、代謝物構造推定試験、代謝安定性試験等による*in vivo*肝代謝クリアランスの予測が、創薬の初期段階に求められています。

HepG2, 初代肝細胞, HepaRG®における  
主要代謝・抱合系酵素活性の比較

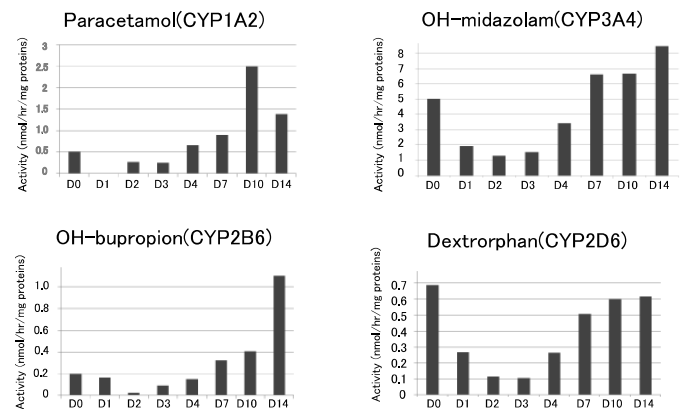


HepG2、凍結ヒト初代肝細胞（3ロット）、HepaRG®（3ロット）を用いて、phenacetin (CYP1A2)、bupropion (CYP2B6)、diclofenac (CYP2C9)、s-mephenytoin (CYP2C19)、bufuralol (CYP2D6)、midazolam (CYP3A4)、7-hydroxycoumarin (UGT、SULT)を1時間曝露した際のPhase I、Phase IIに関わる酵素活性を評価した。  
(Yuichi Yokoyama., et al. Comparison of Drug Metabolism and Its Related Hepatotoxic Effects in HepaRG, Cryopreserved Human Hepatocytes, and HepG2 Cell Cultures. Biol. Pharm. Bull. 41, 722-732 (2018))

HepaRG®播種後の細胞形態



HepaRG®融解後の薬物代謝酵素活性の経時変化



HepaRG®を融解し、Day0、1、2、3、4、7、10、14に主要CYPs (CYP1A2、2B6、3A4、2D6)の酵素活性を確認した。  
Day0- Day1: Medium670、Day1-Day14: Medium620

➤ HepaRG凍結バイアルを使用して薬物代謝試験を行う場合、融解当日またはDay4以降に評価頂くことをお勧めしています。

✓ HepaRG®にはPhase I・Phase IIに関わる主要代謝酵素が発現しており、単層培養条件で長期間培養が可能(~4w)なため、代謝試験に適しています。



Biopredic  
INTERNATIONAL

• H • E • P • A R G ®

最もヒト初代肝細胞に近いセルライン

HepaRG®

THE HEPATIC STEM CELL LINE



HepaRG®専用 web site

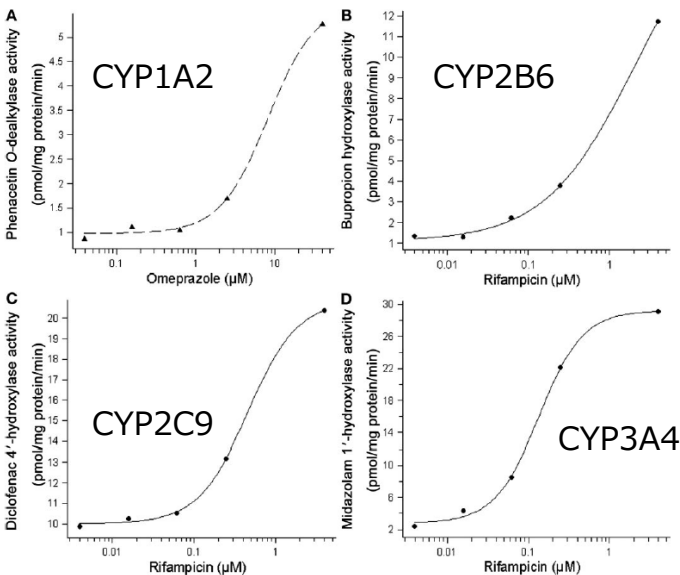
<http://www.heparg.com>

HepaRG®はフランスINSERM（国立医学研究所）で開発されたヒト肝細胞セルラインです。肝細胞様形態を呈し、各種肝機能を保持・発現しており、ヒト初代肝細胞の代替ツールとして薬物動態および毒性試験などに広く利用されています。ロット間差が少なく、創薬の初期段階の評価に適しています。

## 【酵素誘導試験】

主要な薬物代謝酵素であるチトクロムP450s (CYPs) の誘導を引き起こす薬物は、併用薬の代謝消失を亢進することで血中濃度を低下させたり、あるいは、併用薬がプロドラッグの場合には有効成分の血中濃度上昇を引き起こしたりするなどの薬物相互作用を引き起こす可能性があります。そのため、医薬品開発の初期段階で、主要なCYPsについての酵素誘導能評価が求められています。

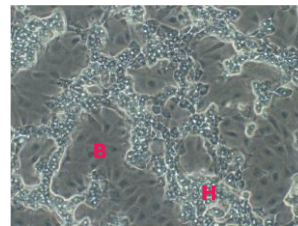
### HepaRG®における主要CYPsの酵素誘導能評価



#### 主要CYPsの酵素誘導能評価

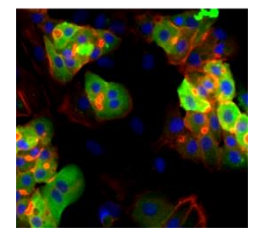
Omeprazole (CYP1A2)、Rifampicin (CYP2B6, 2C9, 3A4) を48時間曝露し、各CYPsの濃度依存的な酵素誘導をそれぞれの酵素活性で評価した。HepaRG® (Passege=14-17) (Kajsa P, Kanebratt., et al. HepaRG Cells as an in Vitro Model for Evaluation of Cytochrome P450 Induction in Humans. DRUG METABOLISM AND DISPOSITION 2008; 36 (1) 137-145

### HepaRG®細胞形態



(B): Biliary - like cells  
(H): Hepatocyte - like cells

### タンパク発現



CYP3A4 (green)  
F-actin (red)  
Nuclei (blue)

### 播種細胞数

プレート	細胞数 (×10 <sup>6</sup> cells/well)	培地量 (mL)
24 well	0.48	0.5
96 well	0.072	0.1

### 推奨タイムスケジュール

Day0	金曜日(朝)	Medium670を使用して融解・播種
	播種 6時間後	Medium670で培地交換
Day3	月曜日(朝)	化合物を添加したMedium640またはMedium650で培地交換
Day4	火曜日(朝)	化合物を添加したMedium640またはMedium650で培地交換 (mRNAでの誘導評価はDay4に実施可能)
Day5	水曜日(朝)	誘導後、基質を添加して評価を行う

✓ HepaRG®にはヒト初代肝細胞を使用した評価におけるドナー間差の問題がなく、ガイドラインで求められた主要CYPsの誘導評価試験を安定して実施いただくことができます。


 Biopredic  
INTERNATIONAL

HEPARG®

最もヒト初代肝細胞に近いセルライン

HepaRG®

THE HEPATIC STEM CELL LINE



HepaRG®専用 web site

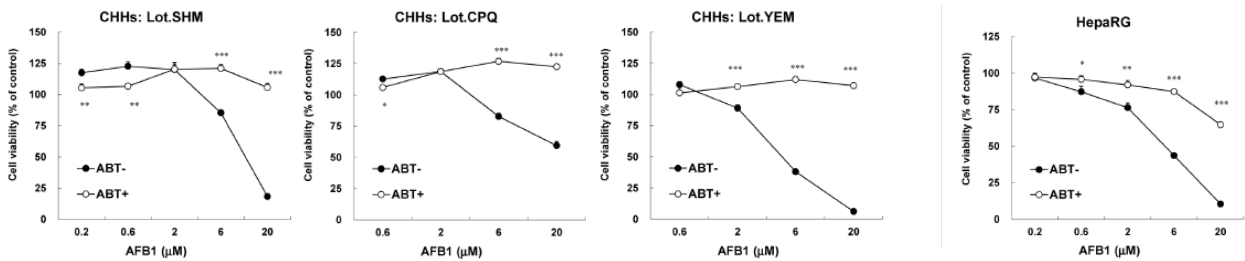
<http://www.heparg.com>

HepaRG®はフランスINSERM（国立医学研究所）で開発されたヒト肝細胞セルラインです。肝細胞様形態を呈し、各種肝機能を保持・発現しており、ヒト初代肝細胞の代替ツールとして薬物動態および毒性試験などに広く利用されています。ロット間差が少なく、創薬の初期段階の評価に適しています。

## 【毒性試験】

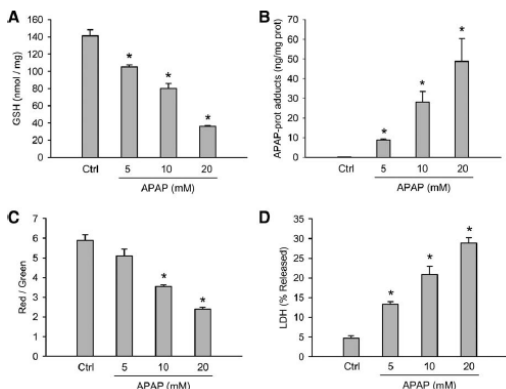
創薬の開発ステージにおいては、候補化合物による毒性が原因でその開発が中止になるケースが多数発生しています。そのため、開発初期の段階で候補化合物の毒性のリスクを予測し、回避するための評価を実施することが非常に重要と考えられています。多くの製薬企業では、ガイドラインに示された一般毒性評価以外にも、*in vitro* の評価系として齧歯類やヒトの初代肝細胞を用いた化合物の毒性評価が行われています。

### 初代肝細胞, HepaRG®における AFB1誘発細胞毒性へのCYP阻害剤の効果



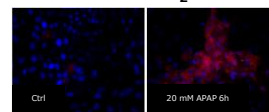
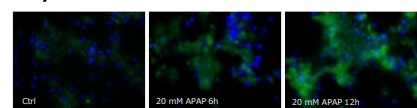
凍結ヒト初代肝細胞 (3ロット)、HepaRGを用いて、Aflatoxin (AFB1) 誘発性細胞毒性へのCYP阻害剤 (1-aminobenzotriazole: ABT) の効果を評価した。細胞生存率は化合物を48hr暴露した後CellTiter-Gloを使用して評価した。  
(Yuichi Yokoyama, et al. Comparison of Drug Metabolism and Its Related Hepatotoxic Effects in HepaRG, Cryopreserved Human Hepatocytes, and HepG2 Cell Cultures. Biol. Pharm. Bull. 41, 722-732 (2018))

### HepaRG®におけるアセトアミノフェン誘発APAP毒性の評価



図示した濃度のアセトアミノフェン(APAP)を HepaRG®に24時間処理し、GSH(A)、APAP結合タンパク(B)、ミトコンドリア膜電位: JC-1 染色(C)、逸脱酵素(D)を評価した。\*P<0.05 (compared to control)  
(Mitchell R. McGill, et al. A Human Model to Study Mechanisms of Acetaminophen Hepatotoxicity. HEPATOLOGY. 53, 974-982 (2011))

### HepaRG®におけるAPAP毒性メカニズムの検証

 MitoSOX Red: O<sub>2</sub><sup>-</sup> 検出薬

 Dihydrorhodamine: ONOO<sup>-</sup> 検出薬


- ✓ 主要代謝酵素の活性を持つHepaRG®を用いれば、代謝物による毒性も*in vitro*で評価可能です。
- ✓ HepaRG®は種差・コストの問題をクリアできる優れた評価ツールです。





Biopredic

HEPARG®

最もヒト初代肝細胞に近いセルライン

HepaRG®

THE HEPATIC STEM CELL LINE



HepaRG®専用 web site

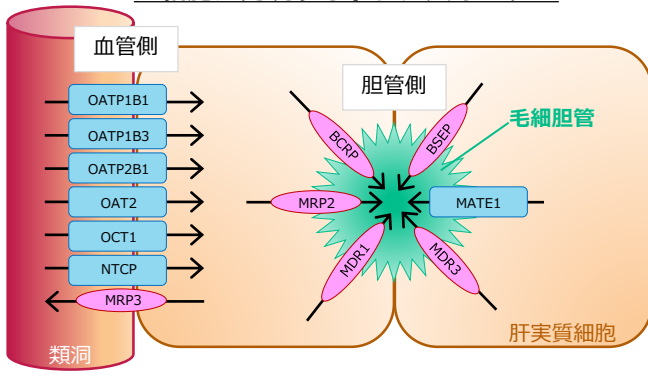
<http://www.heparg.com>

HepaRG®はフランスINSERM（国立医学研究所）で開発されたヒト肝細胞セルラインです。肝細胞様形態を呈し、各種肝機能を保持・発現しており、ヒト初代肝細胞の代替ツールとして薬物動態および毒性試験などに広く利用されています。ロット間差が少なく、創薬の初期段階の評価に適しています。

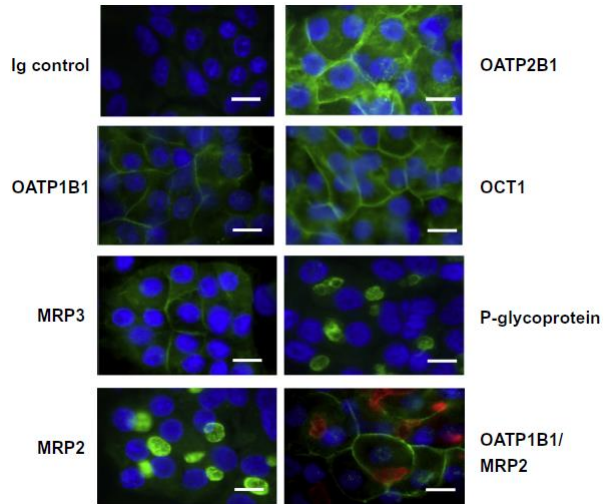
## 【トランスポーター評価試験】

摂取した薬物は、吸収・分布・代謝・排泄のそれぞれの過程を経て体内から消失するが、その多くのステップに様々なトランスポーターが関与していることが知られています。そのため、創薬開発に関わるガイドラインにおいて薬物間相互作用評価試験（開発中の化合物が薬物の体内動態に関わる代表的なトランスポーターの機能に影響するかどうかを調べる試験）を実施することが求められています。

### 肝細胞に発現するトランスポーター



### HepaRG®における各種トランスポーターの発現



HepaRG®に発現するトランスポーターを免疫蛍光染色で確認し、その局在を観察した。青：核染色像、緑：図に示した分子種の免疫蛍光染色像(MRP2を除く)、赤：MRP2免疫蛍光染色像。

\*Bar = 10µm  
(Marc Le Vee., et al. Polarized expression of drug transporters in differentiated human hepatoma HepaRG cells. Toxicology in Vitro. 27, 1979-1986 (2013))

### 肝臓に局在するトランスポーターの発現確認

~HepG2、初代肝細胞、HepaRG®の比較~

トランスポーター	HepG2	初代肝細胞	分化済み HepaRG (DMSO 添加後の期間)			
			(1w)	(2w)	(3w)	(4w)
OATP2B1	+	+	+	+	+	+
OATP1B1	+	+	+	+	+	+
OATP1B3	+	+	+	+	+	+
MDR1	+	+	+	+	+	+
MDR3	+	+	+	+	+	+
MRP1	+	+	+	+	+	+
MRP2	+	+	+	+	+	+
MRP3	+	+	+	+	+	+
BSEP	+	+	+	+	+	+
BCRP	+	+	+	+	+	+

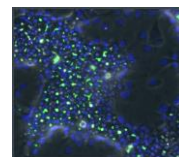
  

N.D.	0.0001-0.01	0.01-0.2	0.2-0.8	0.8-1.2	1.2-2	2.0-5.0	>5.0
------	-------------	----------	---------	---------	-------	---------	------

HepG2、凍結ヒト初代肝細胞、分化後のHepaRGを用いて、肝臓で発現するトランスポーターのmRNAの発現を確認した。

(Kajsa P. Kanebratt., et al. Evaluation of HepaRG Cells as an in Vitro Model for Human Drug Metabolism Studies. DRUG METABOLISM AND DISPOSITION. 36 (7), 1444-1452 (2008))

### HepaRG®の胆汁排泄機能確認



HepaRG®に取り込まれたCDFDAは細胞内で加水分解され、CDF (MRP2で輸送される蛍光基質) に変換される。経時的な蛍光イメージングにより、細胞内で合成されたCDFがMRP2を介して胆管腔に排出されていることが確認された。

✓ HepaRG®には肝実質細胞に発現している薬物トランスポーターの多くが発現しており、薬物間相互作用評価のツールとしてご使用頂くことが可能です。



最もヒト初代肝細胞に近いセルライン

# HepaRG<sup>®</sup>

- ✓ 標準操作手順書をご用意しております。
- ✓ 豊富な国内在庫から迅速に出荷いたします。

\* HepaRG<sup>®</sup>はsingle useの細胞です。

## HepaRG<sup>®</sup> 凍結バイアル

製品番号	品名	包装	価格	輸送	保存
HPR116-8M	HepaRG <sup>®</sup> 凍結バイアル 8M	8×10 <sup>6</sup> vial cells/vial	¥60,000	ドライアイス	LN <sub>2</sub>
HPR116-12M	HepaRG <sup>®</sup> 凍結バイアル 12M	12×10 <sup>6</sup> vial cells/vial	¥82,000		

※細胞お受取り後、速やかに液体窒素に保管して下さい。  
※液体窒素配送をご希望の場合には、別途配送費を頂戴し対応させていただきます。

## 培地・プレート

製品番号	製品名	製品構成	包装	価格	保存
Medium670	Thawing/Plating/General purpose medium	MIL600C×1, ADD670C×1	100 mL	¥20,000	+4℃ -20℃
Medium670-500M	Thawing/Plating/General purpose medium	MIL700C×1, ADD670C×5	500 mL	¥84,000	
Medium620	Maintenance and Metabolism Medium	MIL600C×1, ADD620C×1	100 mL	¥20,000	
Medium620-500M	Maintenance and Metabolism Medium	MIL700C×1, ADD620C×5	500 mL	¥84,000	
Medium640	Induction Medium	MIL600C×1, ADD640C×1	100 mL	¥20,000	
Medium640-500M	Induction Medium	MIL700C×1, ADD640C×5	500 mL	¥84,000	
Medium650	Serum-free Induction Medium	MIL600C×1, ADD650C×1	100 mL	¥20,000	+4℃
Medium650-500M	Serum free Induction Medium	MIL700C×1, ADD650C×5	500 mL	¥84,000	
MIL502	MEM-Earle w/o phenol red and with sodium bicarbonate	MIL502×1	100 mL	¥8,000	
MIL494	William E medium w/o additives, w/o Phenol red	MIL494×1	100 mL	¥6,000	
PLA136	96well コラーゲンコートプレート	PLA136×1	1 枚	¥6,000	
PLA137	24well コラーゲンコートプレート	PLA137×1	1 枚	¥6,000	

## 試験開始に必要な製品

サスペンション培養時		単層培養時	
HPR116-8Mの場合	HepaRG <sup>®</sup> 凍結バイアル 8M ×1 Medium670 (融解用) ×1	HPR116-8Mの場合	HepaRG <sup>®</sup> 凍結バイアル 8M ×1 Medium670 (融解、播種用) ×1 96wellコラーゲンコートプレート ×1
HPR116-12Mの場合	HepaRG <sup>®</sup> 凍結バイアル 12M ×1 Medium670 (融解用) ×1	HPR116-12Mの場合	HepaRG <sup>®</sup> 凍結バイアル 12M ×1 Medium670 (融解、播種用) ×1 24wellコラーゲンコートプレート ×1



## 株式会社ケー・イー・シー

### ▶ 試験事業部

〒661-0978 兵庫県尼崎市久々知西町2丁目1-20  
TEL:06-6435-9747、FAX:06-6435-9748

### ▶ 試験営業グループ

〒110-0005 東京都台東区上野 1-4-4 藤井ビル3F  
TEL:03-5807-7162、FAX:03-5807-7163  
e-mail:shiyaku-info@kacnet.co.jp

