

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月23日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2009～2011

課題番号：21656218

研究課題名（和文） 初代肝細胞の浮遊培養技術の創出による新規な細胞機能評価法の開発

研究課題名（英文） Development of a novel estimation method of cell functions by creating non-adhesive single cell culture technology

研究代表者

井嶋 博之 (IJIMA HIROYUKI)

九州大学・工学研究院・准教授

研究者番号：10274515

研究成果の概要（和文）：

ポリエチレングリコールとアルギニン - グリシン - アスパラギン酸からなる PEG-GRGDS を作製した。PEG-GRGDS は PEG 鎖長に応じた細胞分散効果を有していた。PEG-GRGDS 処理された肝細胞は細胞骨格形成に伴う生存率の向上と良好なアルブミン合成活性ならびに薬物代謝活性を発現した。以上のことから、PEG-GRGDS を用いた初代肝細胞の非接着単一細胞培養技術開発に成功した。

研究成果の概要（英文）：

PEG-GRGDS consisting of polyethylene glycol and arginine - glycine - aspartic acid was prepared. Primary hepatocytes were dispersed by PEG-GRGDS treatment depending on a PEG size. The hepatocytes treated with PEG-GRGDS improved their viability with the cytoskeleton organization, and well expressed albumin production and drug metabolism activities. Therefore, a novel estimation method of cell functions by creating non-adhesive single cell culture technology using PEG-GRGDS was successfully developed.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	0	1,200,000
2010年度	1,000,000	0	1,000,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,100,000	270,000	3,370,000

研究分野：生物化学工学

科研費の分科・細目：プロセス工学 ・ 生物機能・バイオプロセス

キーワード：初代肝細胞、非接着浮遊培養、細胞機能評価、単一細胞培養、PEG-GRGDS、細胞骨格、薬物代謝、アルブミン合成

1. 研究開始当初の背景

動物愛護の観点から、削減(Reduction)、純化(Refinement)および置き換え(Replacement)の遵守が必須となり、創薬や細胞機能評価のための新規培養技術開発が不可欠である。特に、薬物代謝の中心である肝細胞の培養技術

の確立が重要である。肝細胞は付着依存性であるため培養基材への接着が欠かせないが、コラーゲン被覆基材を用いた単層培養では生存は確保されるものの、肝機能発現の維持が困難であった(Table 1)。一方、この20年の間に肝細胞培養技術は飛躍的に進歩し、細胞

組織体（オルガノイド）培養技術や細胞層を二つのコラーゲンゲル層で挟んだコラーゲンゲルサンドイッチ培養技術が開発され、生体外においても生体肝と同様な肝機能発現が可能となった。しかし、これら新規培養系には毛細血管網が存在せず、酸素、栄養素や反応基質等を運ぶ培地との間に多くの細胞層やコラーゲンゲルが存在するため、常に拡散の問題が生じ(Table 1)、真に定量性のある評価法とはなり得なかった。さらに、単層培養を除く培養法では個々の細胞の状態を定量的に評価することが不可能であった(Table 1)。一方、単層培養は光学顕微鏡による個々の細胞状態の評価が容易である。したがって、上記の利点を併せ持つ新規培養技術の創出が切望される。

Table 1 Required conditions to develop drug metabolism simulator/cell function simulator

	Survival	Functionality	Observation	Uniformity	Diffusion
Spheroid	○	○	×	×	×
Monolayer (on collagen film)	○	△	○	×	○
Monolayer (on collagen-adsorbed surface)	○	×	○	×	○
Floating culture	×	×	○	○	○
Microcapsule culture	○	○	○	○	×
Non-Adhesive Single-Cell Culture	○	○	○	○	○

オルガノイドの細胞機能の高発現は立方体状の細胞形態と細胞間相互作用に起因すると考えられている。近年、私は RGD 配列を固定化した培養基材上で肝細胞を培養することにより細胞の過伸展が抑制されると、単層培養にも関わらず、オルガノイド培養と同等もしくはそれ以上の肝機能発現が可能となることを見出した[1]。しかしながら、単層を形成している細胞の伸展度合いによって肝機能発現状態が大きく異なるため、高精度な細胞形態制御技術が必要となり、極めて困難な課題となる。一方、私は適切な培地環境を整えたコラーゲンゲル培養を行うと球状の肝細胞は分散状態でもオルガノイドと同等以上の肝機能を発現できることを見出した[2]。つまり、細胞形態と細胞周囲環境を適切に制御できれば、上述の問題点を克服した新規培養技術の構築が可能であると期待される。

[1] Hiroyuki Ijima, *et al.*, Promote a monolayer formation and highly express the ammonia metabolism of primary rat hepatocyte on a RGD-containing peptide coated polystyrene dish, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Vol.100, No.1, pp.62-66, 2005.

[2] Hiroyuki Ijima, Practical and functional culture technologies for primary hepatocytes, *Biochemical Engineering Journal*, Vol.48,

2. 研究の目的

付着依存性である肝細胞の機能性培養技術は創薬における薬物代謝など様々な応用が期待される重要な技術である。本研究では細胞接着性を有するアルギニン-グリシン-アスパラギン酸(RGD)配列と細胞接着阻害作用を有するポリエチレングリコール(PEG)からなる新規培養基材(PEG-RGD)を開発し、肝細胞の浮遊培養技術という新しい概念を創出する(Fig.1)。さらに、この技術を用いた細胞チップを開発し、新たな評価ツールとしての有効性について検討する。

Non-Adhesive Single-Cell Culture

- : Functionality (*: Spread < Cuboidal)
- : Uniform cell shape (Sphere)
- : Suitable mass transfer
- : Single cell assay

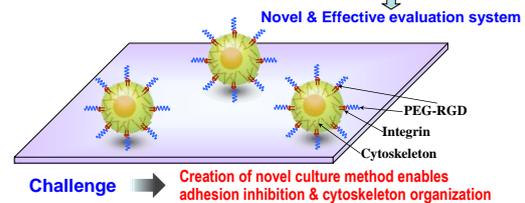


Figure 1 Concept of this study

3. 研究の方法

初代ラット肝細胞はウイスター系雄性ラットからコラゲナーゼ灌流法により取得した。得られた肝細胞を所定濃度の GRGDS 添加培地にて前処理し、RGD 固定化基材であるプロネクチン F（三洋化成）被覆ディッシュ上に播種した。付着細胞数を計数し、肝細胞処理に必要な GRGDS 濃度を求めた。

様々な鎖長の PEG を用いて鎖長の異なる PEG-GRGDS を作製した。一方、フォトリソグラフィ技術により直径と深さが共に 30 μm の小穴を有するポリジメチルシロキサン製の細胞チップを作製した。この小穴内には初代ラット肝細胞 1 個が収容できる。当該基板を細胞低接着化処理し、初代ラット肝細胞の非接着単一細胞培養を行った。この時、細胞骨格染色、細胞のエステラーゼ活性ならびにエトキシレゾルフィン脱エチル化反応による評価を行った。

4. 研究成果

(1) GRGDS 濃度による肝細胞接着率への影響
初代ラット肝細胞のプロネクチン F 被覆ディッシュ上への接着は GRGDS 濃度依存的に阻害され、150 μM GRGDS 処理により、肝細胞のインテグリンを介した接着は十分に阻害された(Fig.2)。一方、大腸菌を用いて強

化緑色蛍光タンパク質(EGFP)-GRGDS を作製し、肝細胞表面における GRGDS 結合密度の評価を試みたが、シグナル強度の問題で結果を得ることはできなかった。

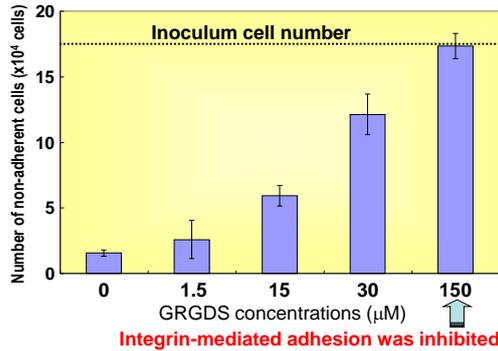


Figure 2 Inhibition of cell adhesion by GRGDS

(2) 細胞分散効果と細胞骨格形成

初代ラット肝細胞を細胞接着阻害処理したディッシュを用いて培養したところ、細胞凝集阻害効果は PEG 鎖の伸長と共に向上し、分子量 20000 の PEG 鎖において十分な細胞分散効果が得られた。この際、分散状態にある非接着培養単一肝細胞のアルブミン合成活性は機能性肝細胞組織体であるスフェロイド培養と同等の高活性を発現できた。

30μm の小穴を有するポリジメチルシロキサン製の細胞チップにて培養したところ、GRGDS、末端に N-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)を有する分子量 5000 および 40000 の PEG である PEG-NHS(5k), PEG-NHS(40k)のいずれにおいても細胞骨格形成は未処理の Control と同等であった。しかしながら、PEG-GRGDS で処理することにより、初代ラット肝細胞の細胞骨格形成は有意に増加した(Fig.3)。つまり、本培養基材を含む培地中に初代ラット肝細胞を懸濁させることで、細胞表面に PEG-GRGDS が結合した培養系が実現でき、非接着単一細胞状態での培養が可能となった。

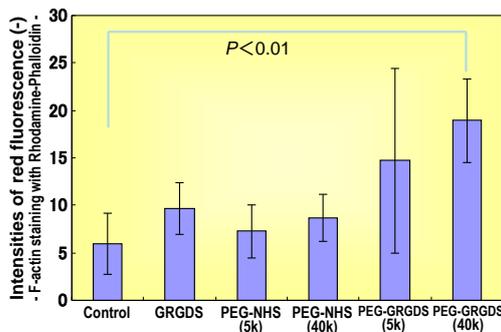


Figure 3 Cytoskeleton organization of hepatocytes in non-adhesive single-cell culture

一方、疑似共焦点顕微鏡による細胞骨格の三次元解析を行ったところ、PEG-GRGDS を

用いて非接着単一細胞培養された初代肝細胞の細胞骨格は生体内における肝組織内のものと類似の構造を呈していた。

(3) 生存率と薬物代謝活性

非接着状態で単一細胞培養すると培養 1 日目には通常全ての肝細胞が死滅しているが、PEG-GRGDS を用いた本培養系では半数の肝細胞が良好に生存していた(Fig.4)。一方、上述の検討により細胞の分散効果は PEG-GRGDS の鎖長依存的に向上していたが、興味深いことに PEG の分子量 5000 と 40000 においては細胞骨格の発達や生存率に対して PEG 鎖長の影響は確認されなかった(Fig.4)。

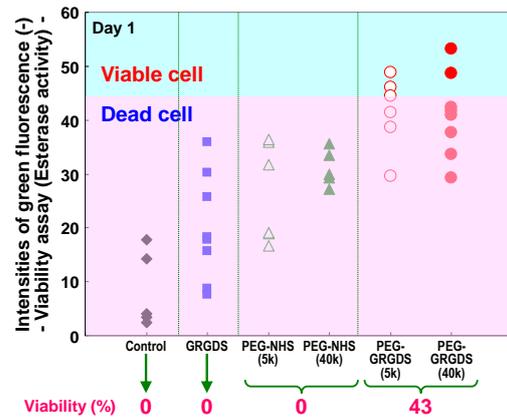


Figure 4 Viability of primary rat hepatocytes in non-adhesive single-cell culture

薬物代謝活性の指標としてエトキシレゾルフィン脱エチル化反応 (EROD 活性) について検討した。PEG-GRGDS 処理された肝細胞の EROD 活性は有意に向上した。さらに、本培養系では EROD 活性における細胞間のばらつきはほとんど無く、細胞機能評価を目的とした初代ラット肝細胞の非接着単一細胞培養技術の優位性が示された(Fig.5)。対照的に、死細胞の EROD 活性は生細胞が有する活性より低く、さらに、大きくばらついていた。その際、死細胞におけるエステラーゼ活

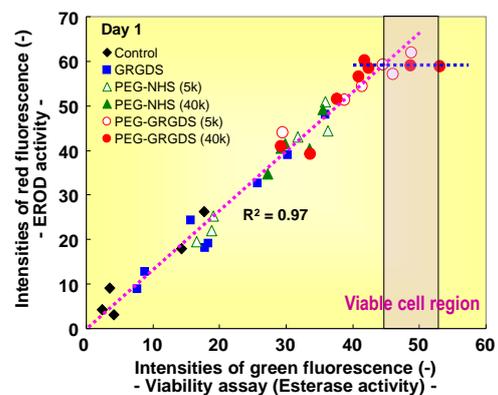


Figure 5 Correlation with survival activity and the drug metabolism activity in non-adhesive single-cell culture

性と EROD 活性との間には正比例関係 (相関係数 0.97) があり、細胞内容物の緩やかな漏洩が上記ばらつきの原因であることがわかった。つまり、PEG-GRGDS を用いた非接着単一細胞培養系により詳細な細胞挙動と正確な細胞活性の評価が可能になることが示された。

(4) 非接着単一細胞培養技術を利用した細胞チップの開発

観察が容易な強化緑色蛍光タンパク質 (EGFP) の両端に GRGDS とシステイン (C) それぞれを配置した GRGDS-EGFP-C を大腸菌を用いた組み換えタンパク質として作製した。金蒸着させたガラス基板を用いた検討により、初代ラット肝細胞と GRGDS-EGFP-C との結合性および GRGDS-EGFP-C と基板との結合性が確認された。これにより、GRGDS-PEG-C を用いた単一細胞培養肝細胞のアンカーリングによる細胞チップ開発への可能性が示された。一方、マイクロコンタクトプリンティングならびにフォトリソグラフィを用いた各種パターン化基板を作製した。これら基板と基板結合部位を導入した PEG-GRGDS とを組み合わせることで、非接着単一細胞の基板上へのアンカーリングを行うことができた。本技術によりアンカーリングされた初代ラット肝細胞はその生存ならびにアルブミン合成活性や薬物代謝活性といった肝特異的機能発現を良好に示した。以上の結果より、PEG-GRGDS を用いた肝細胞の非接着培養系を利用した細胞チップの有効性が示唆された。

(5) まとめと今後の課題

本研究の結果から PEG-GRGDS に基づく初代肝細胞の非接着単一細胞培養技術開発に成功した。当該基材は細胞の分散性ならびに細胞骨格形成による生存が可能であるばかりでなく、多細胞組織体であるスフェロイド培養と同等の肝機能を発現することができた。さらに、個々の細胞レベルでばらつきがほとんどない再現性のある細胞機能評価が可能であった。以上のことから、本研究で開発した新規培養技術は生体類似の培養環境を与える有望な培養系であることが示唆された。

一方、その応用研究としての各種評価系構築はいまだ不十分である。具体的には同種もしくは異種細胞を非接着培養系にて自在配置し、細胞間接着ならびに細胞に由来する各種液性因子の効果の厳密な定量評価系構築にはいまだ至っていない。これら課題の実現にはさらに緻密かつ確実なパターンニング技術が必須である。今後はこれら課題に対する研究を推進していく必要がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 8 件)

- ① Hiroyuki Ijima, Jun-ichi Sakai, Szu-Yuan Chou, Philip R Leduc, Yadong Wang, Non-Adhesive Single Cell Culture for Primary Rat Hepatocytes, TERMIS NA 2010 (annual meeting of the North Americas Chapter of the Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society in 2010), 2010 年 12 月 5 日、Orlando (U.S.A.)
- ② Takayuki Fukuda, Takayuki Takei, Hiroyuki Ijima, Koei Kawakami, RGD-containing molecule for anchoring hepatocytes to cell chip, The 23rd International Symposium on Chemical Engineering, 2010 年 12 月 4 日、九州産業大学 (福岡市)
- ③ 井嶋博之、堺淳一、武井孝行、川上幸衛、初代肝細胞の非接着培養技術の開発、第 32 回日本バイオマテリアル学会大会、2010 年 11 月 29 日、グランドプリンスホテル広島 (広島市)
- ④ 井嶋博之、堺淳一、武井孝行、川上幸衛、初代肝細胞の非接着単一細胞培養、第 3 回化学工学 3 支部合同徳島大会、2010 年 10 月 24 日、徳島大学 (徳島市)
- ⑤ 井嶋博之、堺淳一、武井孝行、川上幸衛、初代肝細胞の非接着単一細胞培養技術の開発、化学工学会 第 42 回秋季大会、2010 年 9 月 8 日、同志社大学 (京都市)
- ⑥ Hiroyuki Ijima, Jun-ichi Sakai, Takayuki Takei, Koei Kawakami, Non-adhesive single-cell culture method for primary rat hepatocyte, The 23rd Annual and International Meeting of the Japanese Association for Animal Cell Technology (JAACT2010), 2010 年 9 月 3 日、北海道大学 (札幌市)
- ⑦ 福田貴之、久保孝文、堺淳一、武井孝行、境慎司、井嶋博之、川上幸衛、RGD 配列と基板への固定化部位を有するタンパク質の開発とその性能評価、第 12 回化学工学会 学生発表会(福岡大会)、2010 年 3 月 6 日、九州大学 (福岡市)
- ⑧ 堺淳一、武井孝行、境慎司、井嶋博之、川上幸衛、壁付着性動物細胞のシングルセル培養のための基礎的検討、第 2 回化学工学 3 支部合同北九州大会、2009 年 10 月 30 日、西日本総合展示場 (北九州市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井嶋 博之 (IJIMA HIROYUKI)

九州大学・大学院工学研究院・准教授

研究者番号：10274515

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし