

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26560216

研究課題名(和文) 高肝機能誘導型スーパーヘパトーマによるバイオ人工肝臓の開発

研究課題名(英文) Development of a bioartificial liver using genetically modified hepatoma cells with inducible high liver functions

研究代表者

上平 正道(Kamihira, Masamichi)

九州大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：40202022

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：申請者は、ヘパトーマ細胞に8種類の肝特異的転写因子遺伝子を同時導入し、人工プロモーターシステムによる導入遺伝子の誘導発現によって、初代肝細胞に匹敵する高レベルの各種肝機能を発揮するスーパーヘパトーマ細胞株の樹立に成功した。本研究では、スーパーヘパトーマ細胞を充填したバイオリアクターを人工肝臓モジュールとする新規のバイオ人工肝臓(Bioartificial liver: BAL)システム構築のために、熱ショックなど新しい機能誘導システムを実装したスーパーヘパトーマ細胞の開発を試みるとともに、人工肝臓モジュール作製のための細胞固定化条件の検討を行った。

研究成果の概要(英文)：We have created genetically modified hepatoma cells (Super-hepatoma) with high liver functions, comparable to those of primary hepatocytes, by inducible overexpression of eight liver-specific transcription factors. To construct a bioartificial liver system using the Super-hepatoma, the cells were modified with a novel induction system for functionalization and the cell immobilization conditions were examined for fabrication of a bioartificial liver module.

研究分野：生物工学

キーワード：生物・生体工学 細胞・組織 バイオリアクター 人工臓器工学

1. 研究開始当初の背景

肝臓は、炭水化物・脂質代謝、タンパク合成、尿素合成、薬剤の変換、老廃物の除去など多様な機能を担っており、激症肝炎や急性肝不全など重篤な肝障害が生じた場合、機能の複雑さから、完全な人工装置で代替することができない臓器である。そのため人工肝臓システムでは、生きた細胞を使用する必要があり、バイオ人工肝臓(BAL)と呼ばれるシステムが考案された。現在までに、臨床用 BAL システムにおいて検討された細胞は、ブタ肝臓から取り出された初代ブタ肝細胞、移植に使われなかったドナー肝由来の初代ヒト肝細胞、肝ガンから樹立されたヘパトーマ細胞である。研究レベルではあるが、マウス ES 細胞から分化誘導された細胞についても検討が行われている。初代肝細胞は、肝機能は高いものの増殖させることが非常に困難であるため、人工肝臓モジュールを作製するたびに、生体肝臓から採取する必要があり、初代ヒト肝細胞は入手が困難であるため、動物由来のものが使われるが人畜共通感染症の問題が指摘されている。また、ヘパトーマ細胞は、培養により増殖させることが可能であるが、肝機能発現の点で初代肝細胞と比べて著しく劣っている。ヒトヘパトーマより樹立された HepaRG 細胞 (Guillouzo et al., *Chem Biol Interact* 2007; 168, 66-73) は、分化因子の添加によって分化誘導されるといったユニークな特徴を有するが、肝機能の長期維持には依然として問題がある。正常核型を有しながら旺盛な増殖能をもつ ES 細胞や iPS 細胞は魅力的な細胞源であるが、これまでの肝細胞への分化誘導では、増殖・分化因子などの添加によって分化誘導するもので、分化に時間がかかり分化効率も低く肝機能も劣るため、今のところ実用的ではない (Matsumoto et al., *Transplant Proc* 2008; 40(2), 614-616)。最近、繊維芽細胞から、複数の転写因子遺伝子を導入して肝機能を有する細胞に誘導する方法が報告されたが (Sekiya & Suzuki, *Nature* 2011; 475, 390-393) 初代肝細胞培養と同様に、肝機能を長期に維持することが難しく、肝機能を発揮するために培地成分に成長因子やホルモンの添加が必須である。申請者らは、500 ほどもあるといわれる肝機能を発揮する細胞を作製するためには、1つ1つの肝機能を担う遺伝子を導入することは現実的ではなく、肝機能関連遺伝子の発現を調節している転写因子を導入することによって少ない導入遺伝子数で多数の肝機能を誘導することが可能であると考え、マウス由来ヘパトーマ Hepa1-6 細胞に、肝機能発現を担っている 8 種類の肝特異的転写因子遺伝子を同時に導入し、初代肝細胞に匹敵する高肝機能を発揮できる細胞株 (Hepa/8F5) の樹立に成功した (Yamamoto et al., *Biochem Eng J* 2012; 70, 67-73)。Hepa/8F5 細胞では、導入遺伝子の発現を薬剤添加によって誘導できるようにしており、通常は、ヘパトーマ細胞の形質とし

て旺盛な増殖を示すが、誘導薬剤を添加すると速やかに増殖を停止し、上皮様細胞に形態が変化するとともに高い肝機能を発揮する細胞へと機能分化する。ES 細胞や iPS 細胞から内在性の転写因子を活性化して肝細胞を分化誘導するのは異なり、外から導入した複数の肝特異的転写因子の強制発現によって肝機能を誘導するため、Hepa/8F5 細胞の培養には、初代肝細胞培養で肝機能維持に必要な成長因子やホルモンなどの添加を必要とせず、通常の培地に誘導薬剤を添加するだけで肝機能発現の誘導と高肝機能状態の維持が可能であるという特徴をもつ。このような細胞株が樹立されたのは世界で初めてであり、本研究では、この細胞の増殖と高肝機能発現を好みのタイミングで切り換え可能な特性を利用した新しいタイプの BAL システムの構築を目指した。

2. 研究の目的

現在、BAL システム開発における最重要課題は臨床用細胞源の確保である。これまで臨床応用の人工肝臓には細胞源として初代ブタ肝細胞を用いるのが主流であったが、内在性ウイルスによる感染の危険性が指摘され、(Fruhauf et al., *Liver Int* 2009; 29(10), 1553-1561) 代替可能な細胞がまだ開発されていないため、近年は停滞状況にある (Podoll et al., *ASAIO J* 2012; 58(5), 443-449)。申請者らは、旺盛な増殖能を有するヘパトーマ細胞に、肝機能発現を転写レベルで調節している 8 種類の肝特異的転写因子遺伝子を同時導入し、導入遺伝子の発現を薬剤添加によってコントロールすることで、増殖と高肝機能発現状態を切り換えることができる細胞株の樹立に成功した (Yamamoto et al., *Biochem Eng J* 2012; 70, 67-73)。導入遺伝子の誘導発現時におけるこの細胞のアルブミン分泌、アンモニア除去能およびシトクローム P450 活性といった肝機能の発現レベルは、初代肝細胞に匹敵するものであった。本研究では、実用的な BAL システムへの適用のため、合成生物学的な遺伝子回路設計アプローチを取り入れることによって導入遺伝子発現法のさらなる改良を試みる。この遺伝子改変ヘパトーマ細胞を用いた新しい BAL システムを開発するために、細胞固定化バイオリクター作製のための基礎検討を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

Hepa8F5 細胞は、DMEM high glucose 培地に 10% FBS および抗生物質 (P & S) を添加した。肝機能の誘導はドキシサイクリン (Dox) により行い、0.1 µg/mL の最終濃度で培地に添加した。肝機能の測定はアルブミン分泌能とアンモニア除去能、シトクローム P450 活性について行い、それぞれ ELISA 法、アンモニア-テストワコー、P450-Glo CYP3A4 Assay を用いて測定した。スフェロイド形成は低接着性 96well プレートを用いて行い、day4 で低接着性 24well プレートに移して培養を続けた。肝機能評価時における培養細胞の細胞数とし

て、スフェロイド中の DNA 量の測定値から換算された値を採用した。DNA 量は DNA 測定キットで測定した。

ゼラチン製のマイクロキャリアである Cultispher-S に細胞播種数をビーズ1個あたり 480 cells とし、50 ml 遠沈管に 10 ml 培地で培養を行った。ビーズ数はプロトコルを参考に、培地 10 ml あたり 5525 個とした (2.65×10^6 cells/tube)。遠沈管は恒温槽につけておき、30 分ごとに攪拌を行い、3 時間培養した。その後、ビーズに接着していない細胞を除くために培地で 2 回洗った。低接着性 24well プレートにビーズ懸濁液を 1 ml ずつ入れ、培養を行った。肝機能はアルブミン分泌能、アンモニア除去能、シトクロム P450 活性について測定を行い、細胞数はスフェロイドと同様、DNA 量によって測定した。

4. 研究成果

(1) 高肝機能維持のための導入遺伝子発現法の検討

Hepa/8F5 細胞では、肝機能をはじめとする肝特異的な遺伝子発現に関与することがわかっている転写因子のうち、HNF-1 α 、HNF-1 β 、HNF-3 β 、HNF-4 α 、HNF-6、C/EBP- α 、C/EBP- β 、C/EBP- γ の 8 種類の肝特異的転写因子の遺伝子を誘導発現システムである Tet-On システムによる発現ユニットとしてマウスヘパトーマ Hepa1-6 細胞にレトロウイルスベクターで導入し、誘導薬剤であるドキシサイクリン（抗菌薬として治療に使われている；Dox）添加によって導入した転写因子遺伝子を発現させることで、高い肝機能を発揮する状態に誘導できる。これまでに、Hepa/8F5 細胞における肝機能誘導は、導入した転写因子の発現に依存しており、8 種類全ての転写因子の発現が高肝機能の誘導に必須であることがわかっている。この細胞では、Dox 添加によって細胞増殖の停止とともに高肝機能が発揮されるが、Dox を抜くと肝機能が徐々に低下してしまうため、長期にわたって高肝機能を維持するためには Dox を入れ続けるか、間欠的に添加する必要がある。BAL システム構築においては、導入遺伝子の発現誘導後は、Dox 添加がなくても高肝機能を継続することが望ましいため、そのための細胞改変を行った。これを実現するための方法として、新たに遺伝子回路を追加する方法を考案した。このシステムでは、1 度 Dox 添加によって誘導された活性化トランスアクチベーターが、常時活性化トランスアクチベーターをポジティブフィードバック的に発現増強するため、導入遺伝子の継続的発現が可能となる。

(2) 熱ショックによって機能誘導可能なスーパーヘパトーマの開発

申請者らは、合成生物学的な遺伝子回路設計アプローチによって、熱ショック誘導型発現増強システム (Yamaguchi et al., *ACS Synthetic Biology*, accepted; Yamaguchi et al., *J Biosci Bioeng* 2012; 114(4), 460-465; Ito et al., *Int J Hyperthermia* 2012; 28(8), 788-798)を開発した。

この遺伝子発現誘導システムを活性化トランスアクチベーターの発現ユニットとして Hepa/8F5 細胞に組み込むことで、熱ショックにより機能誘導可能なヘパトーマ細胞の樹立を行った。また、ヒト臨床応用においてより実用性が高いと考えられる、ヒト由来ヘパトーマ細胞である HepG2 細胞や HuH7 細胞でも Hepa/8F5 細胞樹立と同様の遺伝子工学的改変アプローチによって増殖と高肝機能発現を切換え可能な細胞株が樹立できることを確かめている。バイオリアクターで細胞増幅後、熱ショックによる機能誘導で調製される人工肝臓モジュールは、実用上、非常に魅力的なシステムになりうる。今後、新たに作製した細胞について BAL システムでの評価を行うことによって有用性を確かめる。

(3) バイオリアクターモジュール作製のための細胞固定化条件の検討

BAL システムを構築する前段階として、人工肝臓モジュールとしてバイオリアクターにスーパーヘパトーマを固定化する方法について検討を行った。肝機能は、細胞をスフェロイドと呼ばれる球形の細胞凝集塊にすることで、単層培養に比べ、向上することが知られている。そこで、Hepa/8F5 細胞をスフェロイド培養した結果、細胞数 250 cells/well で播種したとき、最も高い肝機能を得られることがわかった。スフェロイドは大きすぎると内部まで栄養分や酸素が行き渡らず、逆に小さすぎると高肝機能化しない可能性が考えられる。スフェロイド径の限界は 200 μm が限界とされているが、250 cells/well で播種した場合のスフェロイド径は 200 μm に近い値となった。このことから、スフェロイドの最適な播種数は 250 cells/well であることがわかった。続いて、スフェロイドの長期的培養における肝機能を評価した。Dox 添加をスフェロイド形成時から行った条件において、アンモニア除去能が高いレベルで維持されることがわかった。次に、スフェロイドのような 3 次元組織体を大量に調製するため、ゼラチン製多孔質ビーズを用いた固定化培養を行った。最も高い肝機能を示す細胞播種数を調べるため、120、240、480、720、960 cells/beads と変えて検討した。その結果、細胞あたりの肝機能では 480 cells/beads の条件で最も高くなることがわかった。これは、播種数の小さい条件でビーズに接着する細胞数が少なく、細胞間相互作用が向上しなかったためと考えられる。また、播種数の大きい条件では栄養分や酸素が内部まで行き渡らず、内部の細胞が壊死した可能性があるものと考えている。一方、ビーズあたりの肝機能を見ると 960 cells/beads の条件で最も高い肝機能を得られた。これは、播種数が小さくなるにしたがってビーズに接着する細胞数が減少するためと考えられる。480 cells/beads の条件では細胞が高肝機能化しているが、肝機能を発揮する細胞数が少ないため、ビーズあたりの肝機能が低くなったと考えられる。960 cells/beads

の条件では死細胞が観察されたが、ほとんどのビーズに細胞が接着していた。そこで、本研究では細胞あたり、ビーズあたりともに肝機能が高かった 480 cells/beads の播種数が最適であると判断した。

Hepa8F5 細胞を用いてスフェロイド培養を行ったところ、アルブミン分泌能が単層培養と比較して約 1.5 倍向上した。また、Dox 添加で培養し続けたところ、15 日目においても肝機能が維持できることがわかった。さらに、ビーズを用いて固定化培養を行ったところ、480 cells/beads の条件で高い肝機能が得られた。この条件で細胞当たりの機能において初代肝細胞のアルブミン分泌能の約 4/5 であり、ビーズ固定した Hepa8F5 細胞をバイオ人工肝臓システムへ応用することは十分に可能であると考えている。

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 11 件)

(1) 川島 早織, 三分一 孝則, 河邊 佳典, 井藤 彰, 上平 正道、バイオ人工肝臓システム構築のための遺伝子導入ヘパトーマ細胞による三次元培養評価、第 51 回化学関連支部合同九州大会、2014 年 06 月 28 日、北九州国際会議場(北九州市)

(2) Yuto Sonoda, Jane Marie Tonello, Takanori Sambuichi, Hideaki Yamamoto, Yoshinori Kawabe, Akira Ito, Masamichi Kamihira、Transcriptome analysis of gene-engineered hepatoma cells with inducible high liver functions、The 27th Annual and International Meeting of Japanese Association for Animal Cell Technology (JAACT2014)、2014 年 11 月 14 日、北九州国際会議場(北九州市)

(3) 川島 早織, 三分一 孝則, 園田 裕人, Jane Tonello, 河邊 佳典, 井藤 彰, 上平 正道、高肝機能誘導型ヘパトーマ細胞の三次元培養における肝機能評価、化学工学会第 80 年会、2015 年 03 月 20 日、芝浦工業大学(東京)

(4) Jane Tonello, 園田 裕人, 山元 秀晃, 河邊 佳典, 井藤 彰, 上平 正道、Generation of genetically modified hepatoma cells with inducible high liver functions、化学工学会第 80 年会、2015 年 03 月 20 日、芝浦工業大学(東京)

(5) 佐藤 一輝, 園田 裕人, Jane Tonello, 河邊 佳典, 井藤 彰, 上平 正道、遺伝子改変ヘパトーマ細胞の肝機能誘導におけるエピジェネティック薬剤の影響、第 52 回化学関連支部合同九州大会、2015 年 06 月 27 日、北九州国際会議場(北九州市)

(6) 藤井 祐輔, 水本 博, 上平 正道、梶原稔尚、バイオ人工肝臓開発のための中空系を用いた遺伝子導入マウスヘパトーマ細胞の

三次元培養、第 51 回九大生体材料・力学研究会、2015 年 07 月 28 日、九州大学西新プラザ(福岡市)

(7) 水本 博, 藤井 祐輔, 上平 正道、梶原稔尚、バイオ人工肝臓の基盤技術としての遺伝子導入マウスヘパトーマ細胞の中空系培養、化学工学会第 47 回秋季大会、2015 年 09 月 10 日、北海道大学札幌キャンパス(札幌市)

(8) 藤井 祐輔, 水本 博, 上平 正道、梶原稔尚、中空系内三次元培養による遺伝子導入マウスヘパトーマ細胞の肝機能評価、日本機械学会第 26 回バイオフロンティア講演会、2015 年 10 月 02 日、九州大学伊都キャンパス(福岡市)

(9) 佐藤 一輝, 園田 裕人, Jane Tonello, 河邊 佳典, 井藤 彰, 上平 正道、遺伝子改変ヘパトーマ細胞の肝機能誘導における低分子薬剤の影響、化学工学会第 81 年会、2016 年 03 月 13 日、関西大学千里山キャンパス(大阪)

(10) Jane Tonello, 川島 早織, 佐藤 一輝, 河邊 佳典, 井藤 彰, 上平 正道、Three-dimensional culture of a genetically modified hepatoma cell line using macro-porous gelatin

beads、化学工学会第 81 年会、2016 年 03 月 13 日、関西大学千里山キャンパス(大阪)

(11) 藤井 祐輔, 水本 博, 上平 正道、梶原 稔尚、バイオ人工肝臓の基盤技術としての遺伝子導入ヘパトーマ細胞の中空系内三次元培養、第 15 回日本再生医療学会、2016 年 03 月 17 日、大阪国際会議場(大阪)

[その他]

ホームページ等

<http://hyoka.ofc.kyushu-u.ac.jp/search/details/K002690/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上平 正道(KAMIHIRA MASAMICHI)
九州大学・大学院工学研究院・教授
研究者番号: 4 0 2 0 2 0 2 2

(2) 連携研究者

井嶋 博之(IJIMA HIROYUKI)
九州大学・大学院工学研究院・教授
研究者番号: 1 0 2 7 4 5 1 5
水本 博(MIZUMOTO HIROSHI)
九州大学・大学院工学研究院・准教授
研究者番号: 9 0 3 4 6 8 1 7