

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H04439

研究課題名(和文) ヒト初代肝細胞をin vitroで増殖させ長期生存できる革新的培養システムの開発

研究課題名(英文) Development of an innovative culture system for primary human hepatocytes to proliferate and preserve for a long term in vitro

研究代表者

興津 輝 (Okitsu, Teru)

東京大学・医学部附属病院・届出研究員

研究者番号：10378672

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、細胞ファイバ技術を応用し、細胞分裂能と代謝・分泌能が維持されたまま、ヒト初代肝細胞を長期間培養できるシステムの開発である。まずは、ラット初代肝細胞を用いて概念実証を行い、次にヒト初代肝細胞に移行することを目指した。初期細胞密度・成長因子の培地への添加条件の最適化により、コアシェルマイクロファイバ内でラット初代肝細胞を増殖させ、長期培養することに成功した。続いて、創薬・移植医療分野への当該培養システムの応用可能性を示すことができた。最終年度に予定していた、ヒト初代肝細胞を用いた実験は、研究費の再繰越が、連絡の行き違いにより期限を過ぎてしまったことにより、実施できなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果の学術的意義は、簡便な培養システムの開発により、肝細胞が、細胞分裂能と代謝・分泌能を維持したまま、長期生存できる環境を生体外に構築できることを実証したことである。また、その社会的意義は、当該培養システムの創薬・移植医療分野への応用可能性を示したことである。肝臓は、生体の恒常性維持に寄与する重要臓器のひとつである。肝臓を構成する主要細胞である肝細胞の機能を生体外で長期間維持できて、かつ、他施設への普及が容易である培養システムの開発は、医学分野での生理・病理の理解にくわえ、医療/創薬分野における治療法/薬剤の開発・標準化に少なからず貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to develop a system that can culture primary human hepatocytes for a long term while maintaining their proliferation and metabolic/secretory capabilities by applying cell fiber technology. We planned the proof of concept would be performed using primary rat hepatocytes, followed by transition to primary human hepatocytes. By optimizing the conditions of initial cell density and the addition of growth factors to the culture medium, we succeeded in letting primary rat hepatocytes proliferate in core-shell microfibers and culturing them for a long period of time while keeping their hepatic capabilities. Subsequently, the potent usefulness of this culture system in the fields of drug discovery and transplant medicine was demonstrated. The experiment using primary human hepatocytes, which was scheduled for the final year of this project, could not be conducted because the deadline for re-commissioning of the research fund had passed due to a miscommunication.

研究分野：組織移植医療

キーワード：初代肝細胞 細胞培養システム 細胞ファイバ技術 コアシェルマイクロファイバ

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

肝臓は高い再生能を有し、生体の恒常性維持に寄与する重要臓器のひとつである。特に血液中に存在する薬物や毒物を含む化合物の代謝と解毒、生命活動のための血清タンパク質の産生を担うことから、肝臓を構成する主要細胞である肝細胞の機能を生体外で長期間維持することは、医学分野での疾患理解のみならず、医療/創薬分野において治療法/薬剤の開発に大きな貢献をすると考えられている。しかしながら、肝細胞は一旦生体外に取り出された後に従来の培養皿を用いる方法で培養されると、速やかにその高い細胞分裂能と代謝・分泌能を失い、短期間で細胞死に至るということが知られている。既に、初代肝細胞を対象として改良された培養システムがいくつも紙上報告されているが、学術集会などでは、初代肝細胞を扱う研究者の方々からは、学術機関、企業を問わず、初代肝細胞は体外に取り出した後にその本来の機能を急速に失うとの発言が聞かれる。すなわち、紙上報告されたそれらの培養システムはまだ一般的とはなっていないと認識する。そこで、本研究では、医学、医療、創薬分野に大きな進展をもたらすことが期待できるが、まだ実現されていない、初代肝細胞を対象とした、多施設への普及が容易となる培養システムを開発する。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、われわれが独自開発した細胞ファイバ技術を応用することによって、医学、医療、創薬分野において実現が切望されている、ヒト初代肝細胞を長期間に渡って細胞分裂能と代謝・分泌能を維持したまま培養することができるシステムを開発することである。細胞ファイバ技術とは、マイクロ流体力学を応用して同軸2層流を作製し、アルギン酸を外層、細胞と細胞外マトリックス (ECM) を内層に流しながら、アルギン酸を  $Ca^{2+}$  にてゲル化されることで外殻 (シェル) とし、内核 (コア) 部分にファイバ状の3次元組織を構築する技術である (Onoe H, Okitsu T, Takeuchi S, et. al. Nat Mater, 2013)。この技術を初代細胞の3次元培養システムに応用し、既に、ヒト体性幹細胞 (ヒト間葉系幹細胞) から単房の脂肪滴を有する成熟したヒト脂肪組織を作製することに成功している (Hsiao AY, Okitsu T, Takeuchi S, et. al. Adv Healthc Mater, 2015)。また、ヒト iPS 細胞を高効率で増殖させるための培養システムとしても有用であることを明らかにしている (Ikeda K, Okitsu T, Takeuchi S, et. al. Sci Rep, 2017)。細胞ファイバ技術を用いたコアシェルマイクロファイバの作製は、非常に単純な造りのデバイスによって可能となるため、多施設への普及は容易であると考えられる。

### 3. 研究の方法

本研究では、初代肝細胞を長期間にわたって細胞分裂能と、代謝・分泌能を維持したまま生存させることのできる培養システムの構築、続いて、創薬分野・移植医療分野での有用性の検証を、まずはラット初代肝細胞、次にヒト初代肝細胞を用いて行う。すなわち、細胞ファイバ技術によって作製される、アルギン酸のシェルを持つ直径数 100  $\mu m$  のコアシェルマイクロファイバのコア部分にヒト初代肝細胞を封入して培養するシステムの構築がゴールであるが、そのために、まずはラット初代肝細胞を用いた概念実証を行う。これは、ヒト初代肝細胞は、摘出した肝臓の状態、細胞調整の技術的要因などによってロット毎の細胞活性、機能にばらつきが存在するのに対して、ラットからは常に高い細胞活性を有する新鮮な肝細胞を一定量安定して準備することができるからである。このラット初代肝細胞による概念実証を基盤として、ヒト初代肝細胞を用いた研究に進むことを予定した。

### 4. 研究成果

#### 1) ラット初代肝細胞を用いた実験

##### 1.1) 代謝・分泌能を維持したままの長期培養

成体ラットの肝臓から細胞分散用酵素を用いて初代肝細胞を分離し、分離した新鮮なラット初代肝細胞 (生存率: 85%以上) を細胞ファイバ技術によりコアシェルマイクロファイバ内に封入した。

最初に、ラット初代肝細胞がコアシェルマイクロファイバ内で、代謝・分泌能を維持したまま長期培養できることを検証した。まず、予備実験として、コア内に配置する際のラット初代肝細胞の初期細胞密度の検討を行った。具体的には、 $1 \times 10^7$ 、 $2.5 \times 10^7$ 、 $5 \times 10^7$ 、 $9 \times 10^7$  cells/ml の条件でラット初代肝細胞を封入し、48時間培養を行ったところ、 $9 \times 10^7$  cells/ml の群にのみファイバ状組織形成が認められた。それ以外の群では、複数のスフェロイド状の細胞塊の形成が認められたのみであった。 $9 \times 10^7$  cells/ml の初期細胞濃度でラット初代肝細胞をコアシェルマイクロファイバに封入し、培養 2, 4, 7, 21, 30 日目に細胞数、生存率、アルブミン分泌、尿素合成能、CYP 活性の評価を行った。その結果、ラット初代肝細胞はコアシェルマイクロファイバ内で培養 30 日目までは生存し、代謝・分泌能を維持することが判明した。なお、対照群である、コーゲンコート培養皿状での培養では、培養 14 日目にラット初代肝細胞が全て浮遊し、その生存を認めなかった。

### 1.2) 肝細胞分裂能の誘導

続いて、コアシェルマイクロファイバ内で、ラット初代肝細胞を増殖させ、代謝・分泌能を維持したまま長期間培養できることを検証した。まず、コアシェルマイクロファイバに封入したラット初代肝細胞を増殖させるための成長因子を準備した。既報に基づき、マウス線維芽細胞由来 NIH/3T3 のコンディションメディウム (3T3CM) を用いることにした。HGF (肝細胞増殖因子) の含有量を指標にして、培養条件、メディウム採取のタイミングを決定した。

検証実験では、分離したラット初代肝細胞の初期細胞数を  $2.5 \times 10^7$  cells/ml としてコアシェルマイクロファイバ内に封入し、培地に 3T3CM を添加して、細胞の増殖に成功した。さらに、これら増殖したラット初代肝細胞に対して、培養 2, 4, 7, 21, 30 日目に細胞数、生存率、アルブミン分泌、尿素合成能、CYP 活性の評価を行った。その結果、増殖したラット初代肝細胞はコアシェルマイクロファイバ内で培養 30 日目までは生存し、肝細胞としての代謝・分泌能を維持することが判明した。

増殖した細胞を肝細胞特異的表面抗原に対する抗体 (asialoglycoprotein receptor-1 : ASGPR-1) で染色し、フローサイトメトリーを用いて肝細胞であることを確認した。

### 1.3) 薬剤の肝細胞機能障害作用の検出

コアシェルマイクロファイバに封入され増殖したラット初代肝細胞の創薬分野での応用可能性を検証した。具体的には、増殖したラット初代肝細胞を封入しているコアシェルマイクロファイバに、肝障害性化合物 (アセトアミノフェン、ジクロフェナク) を作用させ、両化合物とも 50% 阻害濃度 (IC50) が培養 30 日目まで取得できること、それら IC50 が既報値と類似していることが判明した。

### 1.4) 薬剤の肝再生抑制作用の検出

肝再生抑制効果を持つ化合物 (レトロールシン) を作用させると、容量依存性に、コアシェルマイクロファイバ内でのラット初代肝細胞の細胞分裂が抑制されることが判明したので、細胞分裂抑制を指標として IC50 を決定した。レトロールシンの肝再生抑制効果の *in vitro* での評価系は本研究が最初となるため、決定した IC50 の妥当性を既報との比較で評価することはできなかった。よって、データの再現性をもって妥当性があると判断した。

### 1.5) 移植による生体内での肝機能発現の検証

コアシェルマイクロファイバ内に封入され増殖したラット初代肝細胞の移植医療分野での応用可能性を検証した。具体的には、Nagase 無アルブミン血症ラット (NAR) の腹膜内に、コアシェルマイクロファイバ内で培養したラット初代肝細胞  $2 \times 10^7$  個をコアシェルマイクロファイバに封入したまま、移植した。移植後 35 日までは、NAR の血中アルブミン濃度は改善することが認められた。これにより、移植されたラット初代肝細胞が生体内で生存し、機能を発現することを確認できた。

## 2) ヒト初代肝細胞を用いた実験

細胞ファイバ技術を応用した培養システムの原理検証が、ラット初代肝細胞を用いて完了したので、この研究成果に基づいて、ヒト初代肝細胞に対するコアシェルマイクロファイバをプラットフォームとする培養システムの開発を予定していた。しかしながら、新型コロナウイルス感染症蔓延のため、2 年目の課題の遂行が 2022 年末まで延期したこと、最終年度である 3 年目の研究費の再繰越が連絡の行き違いにより期限を過ぎてしまったことにより、実施できなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Mazari-Arrighi Elsa, Okitsu Teru, Teramae Hiroki, Aoyagi Hoshimi, Kiyosawa Mahiro, Yano Mariko, Chatelain Francois, Fuchs Alexandra, Takeuchi Shoji	4. 巻 12
2. 論文標題 In vitro proliferation and long-term preservation of functional primary rat hepatocytes in cell fibers	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-12679-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
研究協力者	竹内 昌治  (Takeuchi Shoji)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関