

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 25 年 6 月 12 日現在

機関番号：32511

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22790168

研究課題名（和文）ヒト小型肝細胞と内皮細胞の重層化共培養による薬物代謝評価系の構築

研究課題名（英文） Three-dimensional culture of the colony-forming parenchymal hepatocytes and endothelial cells for prediction of drug metabolism.

研究代表者

大野 まき（OHNO MAKI）

帝京平成大学・薬学部・助教

研究者番号：80366765

研究成果の概要（和文）：ヒトにおける薬物の代謝予測にはヒト肝組織を用いる必要があるが、生体外から分離された肝細胞の薬物代謝酵素活性は分離数日後にほぼ消失する。このため、肝細胞機能をより長期間保持し、薬物代謝の評価が可能なヒト肝細胞培養系の構築が求められている。本研究では、肝細胞機能の高い培養系構築のために、温度応答性培養皿を用いて、ヒト小型肝細胞と血管内皮細胞を3次的に重層し、肝小葉構造を模倣した培養系を作製した。その結果、肝細胞機能や薬物代謝酵素の発現活性が高まることがわかった。

研究成果の概要（英文）：Primary human hepatocytes are used extensively to study drug-metabolizing enzymes such as the cytochrome P450 enzymes. However, the activities of these enzymes decrease rapidly during culture. Thus, a more functional culture system is required to obtain the usually high levels of activity and regulation ability of drug metabolizing systems. In the present study, using a thermo-responsive culture dish, layered co-culture was achieved by placing a pulmonary artery endothelial cell sheet onto the human small hepatocyte. The expression levels of drug-metabolizing enzymes were significantly increased, compared with the monolayer cultured small hepatocytes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	0	0	0
2012年度	1,500,000	450,000	1,950,000
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：薬物動態・代謝学

1. 研究開始当初の背景

臨床での薬物治療は、複数の薬物の併用投与が主流である。このため、薬物代謝酵素や薬物の取り込み、排出タンパク質の発現誘導や阻害により、薬物の作用の減弱や副作用の発現が問題となる。薬物の代謝を担う肝臓に

において、薬物代謝システムは、薬物の取り込みと胆汁酸排出、シトクロム P450 をはじめとする第1相代謝酵素や、水溶性の高い官能基を付加する第2相代謝の酵素による代謝から成る。ヒト初代培養肝細胞はこれらの薬物代謝酵素の活性を保持しており、これを用いた解析は、ヒトの *in vivo* 代謝予測を可能

にする。しかし、ヒト初代培養肝細胞は高価で、倫理上も含めた種々の制約から入手が困難である。また、生体外へ取り出された肝細胞は肝再生時に見られる旺盛な増殖能力を急速に失い、増殖しない。薬物代謝酵素の活性低下は顕著であり、分離数日後にはほとんどみられなくなる。このため、より簡便で安価な薬物相互作用評価のために、ヒト薬物代謝酵素活性を長期間保持した、安定供給可能なヒト肝細胞培養系の確立が必要とされている。

肝臓は肝実質細胞と、非実質細胞である内皮細胞などが層状に並んだ肝小葉を基本単位とし、これらの細胞の相互作用によって肝臓の多様な機能が維持されている。これまでに、薬物代謝活性の維持を可能にする肝細胞の培養を目的として、培養した細胞をシート状に回収できる、温度応答性培養皿を用いて、ヒト肝細胞株 HepG2 と血管内皮細胞を層状に培養した、肝小葉の立体構造を模倣した培養系を構築している(Ohno M et al.; Tissue Eng. Part A, 11, 1861-1869 (2008))。この共培養系では、アルブミンやシトクロム P450 遺伝子の発現量が、HepG2 単独培養と比較して、5 倍以上高まっていた。しかし、シトクロム P450 の発現量はヒト肝組織に比べると 10-100 倍低く、創薬の代謝評価に用いるためには、更に高い肝機能を保持した細胞培養系の構築が必要と考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、薬物代謝酵素活性の高い培養系を構築するために、培養した細胞をシートとして回収できる、温度応答性培養皿を用いて、ヒト小型肝細胞と血管内皮細胞を 3 次元的に重層し、重層化共培養系を構築する。ヒト小型肝細胞は、少量の肝組織から分離でき、成熟肝細胞より小型の、肝前駆細胞を含み増殖する肝細胞である。このヒト小型肝細胞に、温度応答性培養皿上で培養してシートとして回収した血管内皮細胞を重層化して、重層化共培養系を構築する。次いで、薬物代謝酵素の遺伝子発現や酵素活性について検討し、薬物代謝評価に有用な培養系となるか解析する。

3. 研究の方法

(1) ヒト小型肝細胞の分離培養

凍結ヒト肝細胞に FBS、ニコチンアミド、EGF、アスコルビン酸、Swiss 3T3 細胞等を加えて培養し、増殖能をもつヒト小型肝細胞を分離培養する。肝細胞特異的タンパク質であ

るアルブミン、 α -1 アンチトリプシンの分泌を ELISA 法により測定する。また、小型肝細胞のマーカーである CD44、Thy-1 の発現を免疫染色法により調べ、小型肝細胞であることを確認する。

(2) ヒト小型肝細胞と内皮細胞を用いた重層化共培養の構築

温度応答性培養皿を用いて、ウシ血管内皮細胞をシート状に培養して回収し、この細胞を、別途培養しておいたヒト小型肝細胞に重層し、重層化共培養系を構築する。

(3) ヒト小型肝細胞と内皮細胞の重層化共培養における、肝細胞機能解析

研究項目 (2) において構築した重層化共培養において、肝細胞機能の指標であるアルブミンの分泌を ELISA 法により測定し、ヒト小型肝細胞単独培養と比較する。

(4) ヒト小型肝細胞と内皮細胞の重層化共培養における、薬物代謝遺伝子の発現解析と活性測定

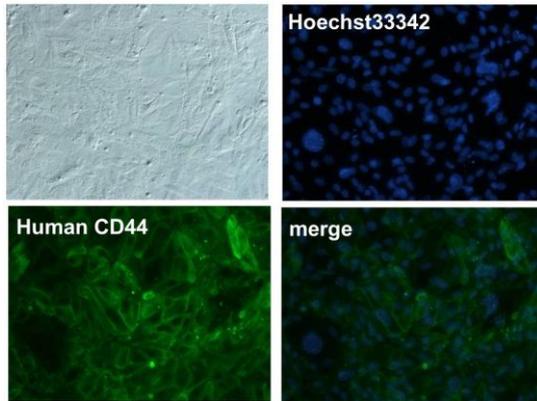
研究項目 (2) において構築した重層化共培養において、薬物代謝遺伝子の発現変化を薬物代謝関連遺伝子の発現を、網羅的かつ定量的に解析できる PCR アレイと特異的プライマーを用いたリアルタイム PCR 法により解析する。また、シトクロム P450 の発光基質を用いて酵素活性を測定する。

4. 研究成果

(1) ヒト小型肝細胞の分離培養

市販の凍結ヒト肝細胞に FBS、ニコチンアミド、EGF、アスコルビン酸、Swiss 3T3 細胞等を加えて培養し、増殖能をもつヒト小型肝細胞を分離培養した。ドナー年齢 4 歳の細胞では 9 回、16 歳の細胞では 6 回の継代が可能であった。培養上清中のアルブミンと α -1 アンチトリプシンの分泌を ELISA 法により測定したところ、それぞれ分泌が確認された。また、小型肝細胞のマーカーである CD44 と Thy-1 の発現を免疫染色法により調べたところ、分離した多くの細胞で CD44 の発現がみられ、Thy-1 陽性の細胞もみられた。このことから、分離した細胞は小型肝細胞であると考えられた。

分離した細胞のCD44 免疫染色像



(2) ヒト小型肝細胞と内皮細胞を用いた重層化共培養の構築

温度応答性培養皿を用いて、ウシ血管内皮細胞をシート状に培養して回収し、この細胞を、別途培養しておいたヒト小型肝細胞に重層し、重層化共培養系を構築した。

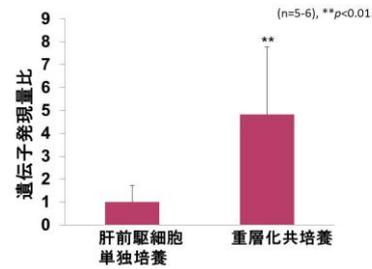
(3) ヒト小型肝細胞と内皮細胞の重層化共培養における、肝細胞機能解析

構築した重層化共培養について、肝細胞機能の指標であるアルブミンの分泌をELISA法により測定し、ヒト小型肝細胞単独培養と比較した。重層化共培養では、重層6日後に小型肝細胞単独培養に比べ約3倍の分泌上昇がみられた。このことから、重層化共培養系において、肝細胞機能が上昇している可能性が示唆された。

(4) ヒト小型肝細胞と内皮細胞の重層化共培養における、薬物代謝遺伝子の発現解析と活性測定

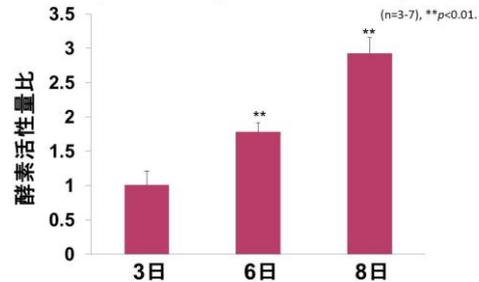
構築した重層化共培養において、薬物代謝遺伝子の発現変化をリアルタイムPCR法で解析した。薬物代謝関連の84種類の遺伝子についてPCRアレイを用いて発現量を測定したところ、第1相酵素遺伝子や第2相酵素遺伝子14種類について、小型肝細胞単独培養に比べて3倍以上の発現上昇がみられた。また、薬物代謝酵素遺伝子の特異的プライマーを設計し、リアルタイムPCRにより遺伝子発現を解析したところ、CYP3A4遺伝子は、小型肝細胞単独培養に比べて、重層化7日後に約5倍の発現上昇がみられた。

重層化共培養におけるCYP3A4遺伝子の発現量比
(重層化共培養 / 小型肝細胞単独培養)



また、重層化共培養において、発光基質を用いてCYP3A4の酵素活性を測定したところ、小型肝細胞単独培養に比べて重層6日目に1.7倍、8日目に3倍の活性上昇がみられた。これらの結果より、作製したヒト小型肝細胞と内皮細胞の重層化共培養系は、薬物代謝関連遺伝子の発現や活性が小型肝細胞単独培養よりも高く保持されており、薬物代謝評価系として有用となる可能性が示唆された。

重層化共培養におけるCYP3A4の酵素活性比
(重層化共培養 / 小型肝細胞単独培養)



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)

[雑誌論文] (計4件)

- ① Kobayashi M, Tsutsui TW, Kobayashi T, Ohno M, Higo Y, Inaba T, Tsutsui T. Sensitivity of human dental pulp cells to eighteen chemical agents used for endodontic treatments in dentistry. *Odontology*. 2013;101(1):43-51. 査読有
- ② Takagi S, Ohno M, Ohashi K, Utoh R, Tatsumi K, Okano T. Cell shape regulation based on hepatocyte sheet engineering technologies. *Cell Transplant*. 2012;21(2-3):411-20. 査読有
- ③ Okamura K, Ohno M, Tsutsui T. Possible involvement of loss of imprinting in

immortalization of human fibroblasts.

Int J Oncol. 2011;38(4):903-10. 査読有

- ④ Taniguchi A, Wada K, Ohno M.
Development of novel culture system
using nano-biotechnology. Yakugaku
Zasshi. 2010;130(4):529-35. 査読有

[学会発表] (計1件)

- ① 大野まき、大橋一夫、鶴頭理恵、石田 功、
3次元共培養法によるヒト肝前駆細胞を
用いた薬物代謝評価系の構築 第133回
日本薬学会年会：2013年3月27-30日：
横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大野 まき (OHNO MAKI)

帝京平成大学・薬学部・助教

研究者番号：80366765