

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 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：2013～2016

課題番号：25860124

研究課題名(和文) 微小ハイドロゲルファイバー内充填培養によるヒト肝複合組織体の薬物代謝研究への応用

研究課題名(英文) The drug metabolizing enzyme activity of human liver progenitor cells in gel culture

研究代表者

大野 まき (Ohno, Maki)

帝京平成大学・薬学部・講師

研究者番号：80366765

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトにおける薬物代謝を予測するには、薬物代謝酵素の活性などの肝細胞機能を長期間保持したヒト肝細胞培養系が必要である。しかし、生体外から分離された肝細胞の薬物代謝酵素は、分離数日後にほぼ消失する。そのため、薬物代謝酵素活性などを高いレベルで保持したヒト肝細胞培養系が必要である。本研究では、凍結ヒト肝細胞からヒト肝前駆細胞を分離し、ゲル内で内皮細胞と共培養を行い、肝小葉を模倣した培養系を構築して肝細胞機能について調べた。ゲル内ではヒト肝前駆細胞はスフェロイドを形成し、平面培養よりも高い肝細胞機能を示した。また、内皮細胞の培養上清を加えた培養系では、薬物代謝酵素活性が上昇した。

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, hepatic progenitor cells were isolated and cultured, and a mixed culture system with endothelial cells was constructed in the gel. In the gel, hepatic progenitor cells formed spheroid, and the hepatocyte function increased in comparison with the monolayered culture. When the culture supernatant of endothelial cells was added in the gel, the drug metabolizing enzyme activity increased.

研究分野：薬物代謝

キーワード：薬物代謝酵素

1. 研究開始当初の背景

肝臓における薬物代謝は、薬物の取り込み、胆汁酸排出、シトクロム P450 などの第 1 相代謝酵素、水溶性の高い官能基を付加する第 2 相代謝酵素による代謝から成る。薬物治療は、複数の薬物の併用投与が主流であり、相互作用による代謝酵素や排出タンパク質の発現誘導・阻害が問題となる。ヒト初代培養肝細胞は薬物代謝酵素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、ヒト初代培養細胞は高価で、倫理面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増殖能力を急速に失い、薬物代謝酵素の活性は、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構造を基本単位とし、これらの相互作用により、多様な機能を維持している。これまでに、ヒト肝細胞株 HepG2 と血管内皮細胞を積層し、肝小葉の立体構造を模倣した培養系を構築している(Ohno et al. *Tissue Eng. Part A*, 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 の単独培養と比較して、5 倍以上高まった。しかし、シトクロム P450 の発現量はヒト肝組織に比べて低く、より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

本研究は、薬物代謝酵素活性の高い培養系の構築を目的とする。ヒト凍結肝細胞から、増殖能と肝細胞機能を有する肝前駆細胞を分離し、これを用いて肝小葉構造を模倣した培養系を構築する。肝前駆細胞と内皮細胞をゲル内で混合培養しアルブミン分泌量や薬物代謝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) ヒト肝前駆細胞の分離と培養

凍結ヒト肝細胞に、ニコチンアミド、インスリン、デキサメタゾン、EGF、アスコルビン酸、ヒト血清、FBS、マイトマイシン C 処理した Swiss 3T3 細胞等を加えて培養し、増殖能をもつ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、1-アンチトリプシンの分泌を ELISA 法にて測定し、分離した細胞が肝細胞機能を有することを確認する。また、肝前駆細胞のマーカである CD44、Thy-1 の発現について、免疫染色法を用いて確認する。

(2) ゲルを用いたヒト肝前駆細胞と内皮細胞の混合培養と肝機能測定

分離した肝前駆細胞を用いた培養系を構築する。ゲル内において、肝前駆細胞単独培

養、肝前駆細胞と血管内皮細胞の混合培養を行う。星細胞との共培養系やセルカルチャーインサートを用いた培養系も併せて構築する。構築した培養系について、肝細胞機能の指標であるアルブミンと 1-アンチトリプシンの分泌を ELISA 法により測定する。また、シトクロム P450 の発光基質を用いて酵素活性を検討し、薬剤を用いた酵素誘導能についても測定する。

4. 研究成果

(1) ヒト肝前駆細胞の分離と培養

市販の凍結ヒト肝細胞に、FBS、ヒト血清、ニコチンアミド、インスリン、デキサメタゾン、EGF、アスコルビン酸、マイトマイシン C 処理した Swiss 3T3 細胞等を加えて培養し、増殖能を有する肝前駆細胞を分離培養した。3 ドナー由来の 6 - 9 回程度継代培養可能な肝前駆細胞を得た。肝細胞特異的タンパク質である、1-アンチトリプシンとアルブミンが培養上清中に分泌されていることを ELISA 法により確認した。また、肝前駆細胞のマーカである CD44 と Thy-1 の発現を免疫染色法により調べ、分離したほとんどの細胞に CD44 の発現がみられ(図 1)、Thy-1 陽性の細胞も確認された。このことから、増殖能を有するヒト肝前駆細胞が分離できたと考えられた。

CD44の免疫染色像 (passage 3)

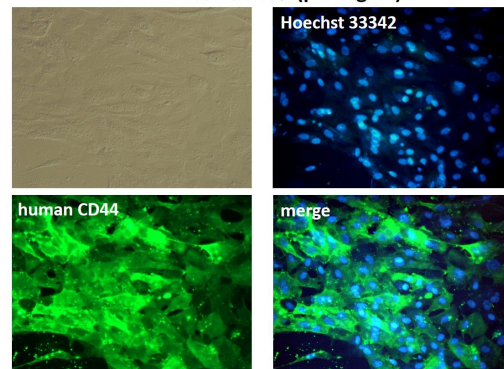


図 1

肝前駆細胞の分離には 10% の新鮮ヒト血清と 5% の FBS を添加したが、新鮮ヒト血清は安定供給が困難なため、新鮮ヒト血清を除去した培養条件を検討した。新鮮ヒト血清の代わりに 15% の FBS を加えた培養系では増殖が遅く、4 日目以降はあまり増殖しなかった(図 2)。

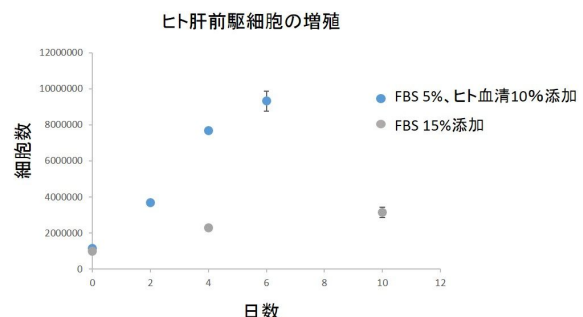


図 2

凍結ヒト血清を 10% 添加した培養系では、FBS のみの培養系と同程度の増殖率であり、凍結により活性を失う因子がヒト肝前駆細胞の増殖に必要なと考えられた。EGF を 2 倍量添加した培養系においても、FBS のみの培養系と同程度の増殖率であった。

(2) ゲルを用いたヒト肝前駆細胞と内皮細胞の混合培養と肝機能測定

新鮮ヒト血清を除去した培養系では、細胞増殖が遅いことから、分裂回数の少ない、肝細胞機能の高い細胞を用いるために、ゲルファイバー内充填培養より小さなスケールで、ゲル内での肝複合組織体を構築した。Thick Gel 法により、マトリゲル上で肝前駆細胞を培養すると、細胞はスフェロイド様となった(図3)。ゲル上の培養では、 α 1-アンチトリプシンの分泌が培養4日後に平面培養に比べ3.5倍上昇した(図4)。

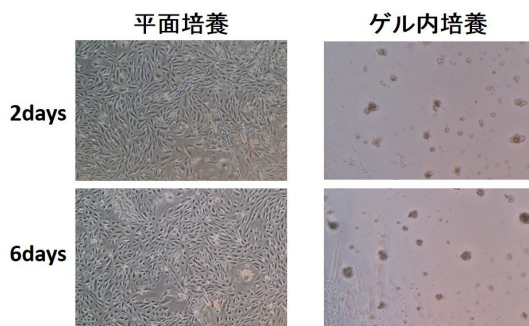


図3

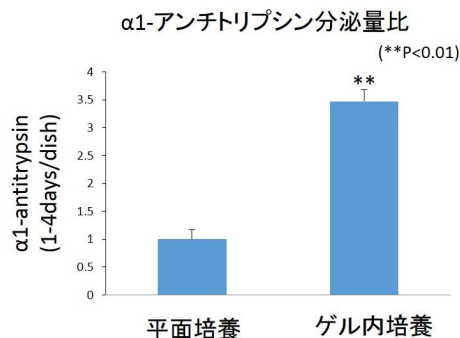


図4

肝小葉構造を模倣した培養系を構築するため、ゲル内で肝前駆細胞とウシ血管内皮細胞の混合培養を行ったところ、肝前駆細胞単独に比べ、より大きなスフェロイドを形成した。ゲル内での肝前駆細胞と内皮細胞の混合培養について肝前駆細胞単独培養を比較したところ、アルブミン分泌、CYP3A4の活性は同程度であった。また、いずれの培養系でも、フェノバルビタールによるCYP3A4の誘導がみられなかった。マトリゲルを肝前駆細胞に重層した培養系におけるCYP3A4の活性は、肝前駆細胞の平面培養と同程度であった。肝小葉中の細胞である星細胞を用いて、ヒト星細胞株(LI90)と肝前駆細胞、内皮細胞の混合培養系についても、CYP3A4の活性はヒト星細胞を添加しない培養系と同程度であった。

ゲル内培養において、内皮細胞の培養上清を添加した培養系では、肝前駆細胞単独培養に比べてCYP3A4の活性が1.3倍上昇した(図5)。

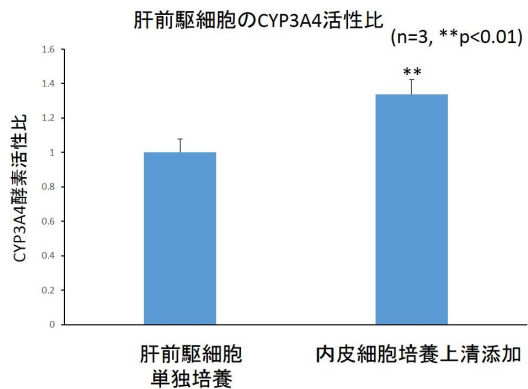


図5

ヒト肝前駆細胞のゲル内培養では肝細胞機能の上昇がみられた。しかし、ゲル内で内皮細胞などの異種細胞との混合培養を行っても薬物代謝酵素の活性は上昇しなかった。ゲル内でのヒト肝前駆細胞に内皮細胞の培養上清を加えるとやや薬物代謝酵素活性が上昇したことから、肝前駆細胞の酵素活性が異種細胞の相互作用により上昇する可能性が示唆された。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

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・講師

研究者番号：80366765

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし

(4)研究協力者

該当なし