

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：37401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26420804

研究課題名(和文) 三次元培養モジュールを用いたヒト肝細胞への化学物質の毒性評価法に関する研究

研究課題名(英文) Studies on the evaluation method for chemical compound toxicity to human hepatocytes by using hollow fiber type three dimensional culture module

研究代表者

松下 琢 (MATSUSHITA, Taku)

崇城大学・生物生命学部・教授

研究者番号：10209538

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：現在地球上にある約3万種類ある既存化学物質の安全性評価を行うために、ヒト肝細胞の三次元培養モジュールを用いた化学物質の毒性評価法の確立のための基礎研究を行った。その結果、このモジュールを用いて成人肝細胞の亜急性毒性に必要な1か月間の生存及び機能維持に成功した。500種類以上ある肝機能の評価を迅速に行うために188の肝機能関連遺伝子解析用DNAチップを開発し、その再現性の確認を行った。胎児肝細胞は成人肝細胞に比べてミトコンドリア(MT)活性が低いことが遺伝子解析等で明らかとなり、化学物質に対する毒性発現の違いがMT活性の違いに依存している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The toxicity of about 30,000 chemical compounds on the earth should be evaluated by using in vitro cell-based assay system including three-dimensional (3D) culture module. In this research, (1) we have succeeded in the maintenance of the cell viability and CYP3A4 activity of the cryopreserved human hepatocytes for about one month by perfusion culture using this 3D culture module. (2) We have developed the customized human hepatocyte DNA chip including 188 hepatic function related genes for rapid analysis of hepatic functions of the cells and confirmed the reproducibility of the analysis. (3) It was found by the DNA analysis and so on that the content and activity of mitochondria of fetal hepatocytes were lower than those of adult hepatocytes. And it was suggested that the toxicity differences of several chemical compounds between fetal and adult hepatocytes were depended on their mitochondrial contents and activities.

研究分野：工学

キーワード：三次元培養性試験 胎児肝細胞 成人肝細胞 化学物質 毒性評価 亜急性毒性試験 動物実験代替法 安全

1. 研究開始当初の背景

化学物質の人体に対する感受性は、成人に比べて成長期の個体（胎児・新生児）において高いと考えられている。また、胎児期における健康被害は長期間にわたる場合や、恒久的な障害が起こる場合があるため、臨床試験が不可能で、これまで主に動物実験が行われてきた。しかし、個体の成長期は、動物実験の結果からヒトへの外挿が難しい時期でもあり、また、大量の動物を犠牲にすることに対する倫理的問題もある。

一方、わが国では、国際的な化学物質管理に関する戦略的アプローチ(SAICM)に沿って、2020年までに、約3万種類ある既存化学物質の安全性評価を行うことが重要な政策課題（閣議決定）となっている。

上記の動物実験による安全性評価のペースは、多くとも1年間に約100件の化合物程度であり、このままでは、上述のSAICMに沿って、2020年までに化学物質の安全性について網羅的に把握することは困難である。そこで、動物実験を代替するヒト胎児細胞および成人細胞を用いた評価系の開発が強く求められている。取り分け、重要な薬物代謝器官である肝臓は、胎児において、成人とは機能に差異があることが知られており、胎児および成人肝細胞を用いた評価系の開発は、わが国においても喫緊の課題である。

このような背景で、肝細胞、あるいは肝ミクロソームを用いた毒性評価実験は、これまでも行われてきた。しかし、図1に示すように、例えばある種の抗生物質の血中・培地中の濃度変化は、肝細胞単層培養系や肝ミクロソーム実験系では再現できず、唯一肝還流実験系で再現されている。しかし肝還流実験もヒト肝臓では困難であり、そのため、肝臓と同様な肝細胞の三次元培養系や、培地や血液などの還流培養を実現するためのモジュールの開発が課題とされてきた。

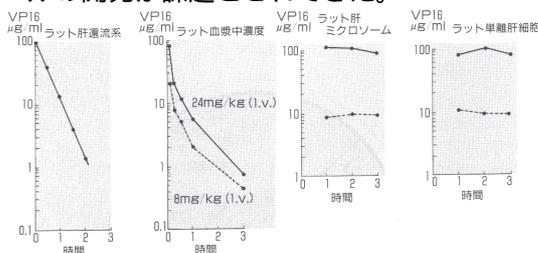


図1 種々の実験系による抗生物質 VP16 の消失パターン (出典: 毒性試験動物代替法、佐藤・佐藤・遠藤編、佐藤哲男著、築光堂、1993)

これに対し研究代表者は、2008年より三菱レイヨン(株)横浜技術研究所との共同研究で、同社が有するガス透過性中空系を利用した三次元細胞培養モジュール(図2)の開発を行い、これまで8件の特許を登録・公開・出願してきた。他の細胞に比べ酸素消費速度の速い肝細胞は、この三次元培養モジュールでの培養に適しており、すでにヒト胎児肝細胞で約130日間、成人肝細胞で約30日間の長期維持培養に成功している。

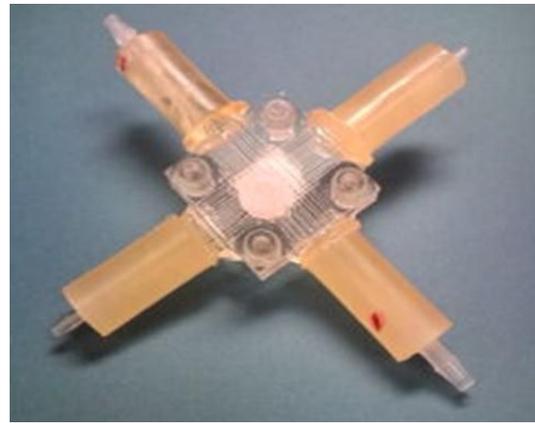


図2 三次元細胞培養モジュール

また一方で、研究代表者は、国立医薬品食品研究所薬理部の石田博士と共同で、ヒト胎児肝細胞と、そこから誘導した肝幹細胞の一種の肝芽細胞、そしてその三次元培養系を利用して、成人肝細胞と胎児肝細胞のトランスクリプトミクス解析・メタボローム解析を行い、両者の違いを比較検討した。また種々の化学物質に対する感受性の違いを評価してきた。その結果、尿素回路の中間体がヒト成人肝細胞で多く、その代謝反応に関与する酵素の発現も胎児肝細胞に比べ成人肝細胞で上昇しており、胎児の肝臓では成体に比べ、尿素回路の代謝活性が低いことが示唆された。また、同様にグルクロン酸抱合も胎児肝において低いことが示唆された。さらに、ヒト胎児由来肝細胞とヒト成人肝細胞に、all-trans レチノイン酸(急性前骨髄性白血病治療薬)、酢酸鉛(染料)、トリブチルすず(殺菌剤)、セレン酸ナトリウム(メッキ添加剤)を暴露し、毒性発現を調べると、胎児肝由来肝細胞とヒト成人肝細胞で毒性発現に差異が観察され、胎児・新生児において成体とは機能に差異があることを示唆する結果を得た。

2. 研究の目的

本研究では、これまでの研究成果を活かし、上述のSAICMを踏まえて、動物実験を代替するヒト肝細胞を用いたin vitroの化学物質毒性評価実験系を確立するための知見を得ることを目的とする。そのために、本研究では、化学物質の中心的代謝臓器である肝臓について、研究代表者が、研究分担者の石田博士(国立医薬品食品衛生研究所)と行ってきたヒト胎児および成人肝細胞の三次元培養に関する知見と、研究協力者の渋谷博士(三菱レイヨン)と開発してきた三次元培養モジュールを組み合わせ、種々の化学物質のヒト胎児及び成人肝細胞への低濃度長期暴露による毒性評価(亜急性毒性)などに関する知見を得ようとするものである。

3. 研究の方法

(1)トランスクリプトミクス解析・メタボローム解析の結果を踏まえた各種化学物質のIC₅₀値測定

尿素回路・グルクロン酸抱合で代謝される化学物質に対する IC₅₀ 値測定

これまでのヒト胎児肝細胞及び成人肝細胞のトランスクリプトミクス解析・メタボローム解析の結果を踏まえ、胎児肝で活性が低いと予測される尿素回路およびグルクロン酸抱合で代謝される化学物質（アセトアミノフェン（解熱鎮痛剤）とバルプロ酸（抗てんかん剤）など）に焦点を絞り、両細胞への暴露実験を行うとともに、その IC₅₀ 値の違いから、成人と胎児での感受性の違いを推定する。また、肝臓と同様に、発達期の神経系に影響すると考えられている化学物質のリストから、トリブチルスズ（殺菌剤・塗料）、酢酸鉛（染料）、all-trans-レチノイン酸、パーフルオロオクタンスルホン酸カリウム（PFOS）についても同様に検討する。ヒト胎児肝細胞は DS ファーマ社から、成人肝細胞は BIOPREDIC 社から市販の細胞を購入する。IC₅₀ 値の測定には、96 穴プレートの静置培養と WST-8 アッセイを用いる。

化学物質暴露細胞のトランスクリプトミクス解析

上記の実験系において、IC₅₀ 値の測定だけでなく、化学物質を暴露した細胞から、DNA 及び RNA を抽出し、Gene Chip を用いてトランスクリプトミクス解析を行う。すでに、化学物質を暴露していない細胞のトランスクリプトミクス解析を終えており、両者の比較から、化学物質の暴露によって変化する遺伝子の網羅的解析を行い、毒性評価に適したマーカー遺伝子の探索を行う。

(2) 三次元培養モジュールを用いた化学物質の低濃度長期暴露実験

本モジュールを用いた上記の化学物質の IC₅₀ 値以下の低濃度での長期暴露実験

三次元培養モジュールでは、現在、ヒト胎児肝細胞では 100 日間以上、成人肝細胞では約 30 日間の機能維持が確認されている。そこで、上記の化学物質の IC₅₀ 値以下の低濃度での長期暴露実験を、このモジュールを使って行い、亜急性毒性（28 日間連続投与毒性試験）についても、評価可能かどうかの検証を行う。細胞の毒性評価は、肝細胞からの漏出酵素（LDH（乳酸脱水素酵素）・AST（アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ）・ALT（アラニンアミノトランスフェラーゼ））などの活性測定によって行う。

化学物質を長期暴露した細胞のトランスクリプトミクス解析

本三次元培養モジュールを用いて、上記の化学物質を長期暴露した胎児肝細胞及び成人肝細胞から、DNA 及び RNA を抽出し、Gene Chip を用いてトランスクリプトミクス解析を行う。すでに、化学物質を暴露していない細胞のトランスクリプトミクス解析を終えており、両者の比較から、化学物質の暴露によって変化する遺伝子の網羅的解析を行い、亜急性毒性評価に適したマーカー遺伝子の

探索を行う。

4. 研究成果

(1) トランスクリプトミクス解析・メタボローム解析の結果を踏まえた各種化学物質の IC₅₀ 値測定

メタボローム解析の結果、胎児肝細胞のエネルギー代謝は解糖系に依存し、成人肝細胞では TCA 回路に依存していることが示唆された。また、胎児肝細胞の尿素回路の活性も低いことが示唆されたため、両細胞のミトコンドリア含有量をフローサイトメーターによって解析したところ、胎児肝細胞中のミトコンドリアは、成人肝細胞の約半分ほどの含有量であることが示された。

また、5 種類の化学物質（トリブチルスズ・バルプロ酸・PFOS・レチノイン酸・アセトアミノフェン）を暴露し IC₅₀ 値を測定した結果、トリブチルスズ、バルプロ酸、アセトアミノフェンは、胎児肝細胞で感受性が高く（低い IC₅₀ 値）逆に PFOS とレチノイン酸は、成人肝細胞で感受性が高かった。トリブチルスズ、バルプロ酸、アセトアミノフェンは、様々な毒性発生機序が報告されているが、胎児肝細胞のミトコンドリア活性の低さが原因となっていることが示唆され、メタボローム解析の結果と一致した。これによって、今後、ミトコンドリア活性に影響を与える化学物質は、胎児肝細胞への毒性の感受性が高まることが予測された。

肝細胞は、その機能が 500 種類以上にわたるため、研究者によって、その焦点を当てる機能が異なることがあり、その結果を比較しづらい点が存在する。そのため、肝機能の標準的な解析方法として、肝機能評価用の DNA チップ（Genopal® customized Hepatocyte chip）を三菱レイヨン社と共同で開発した。このチップには、遺伝子発現量を基準化するためのハウスキーピング遺伝子 5 を含む肝機能に関する遺伝子 188 を搭載している。まず、この DNA チップの再現性を確認した結果、良好な相関性と再現性を得ることができた。また、このチップを使って、アセトアミノフェン代謝に関わる遺伝子の発現解析を行ったところ、主たる代謝経路のグルクロン酸抱合（UDP - グルクロン酸転移酵素（UGT1A1）の発現量が成人に比べて胎児肝では約 1/500 と低く、その結果、強い毒性を持つ N-アセチル-p-ベンゾキノニンイミン（NAPQI）が胎児で生成しやすいことが示唆された。

(2) 三次元培養モジュールを用いた化学物質の低濃度長期暴露実験

肝細胞を用いた化学物質の亜急性毒性試験法の確立には、より長期間の肝細胞の維持培養が必要であるため、まず長期維持培養について、本モジュールを用いて検討を行った。その結果、10⁸ cells/cm³-module の高細胞密度状態で、最長 156 日間の維持培養が可能であった。また、ヒト肝細胞において、薬物を含む化学物質代謝の中心酵素である CYP3A4 活

性も、培養 131 日まで生体内と同じレベルの活性を有していることが明らかとなった。

また、製薬企業等との聞き取り調査によって、亜急性毒性を示す薬物の代表として、抗糖尿病治療薬トログリタゾンによる肝障害が有名であることが判明したため、その薬物の低濃度長期暴露実験の条件設定を行い、三次元モジュール内での細胞の生存評価法などについて、基礎的知見を得ることができた。

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 9 件)

T. Mizutami, T. Ishii, Y. Komizu, T. Iwasa, M. Kawabe, N. Togawa, S. Ishida, T. Matsushita, Maintenance of viability and functional expression of cryopreserved human hepatocytes using silicate fiber-based three-dimensional scaffold, *AATEX*, 査読有, **22**, 印刷中 (2017).

T. Mizutami, Y. Ohta, M. Nakamura, Y. Komizu, T. Iwasa, K. Sasaki, R. Watanabe, M. Kawabe, T. Matsushita, Induction of drug resistance in human hepatoma cells cultured on a silicate fiber-based 3D scaffold, *Adv. Biochem. Biotechnol.*, 査読有, **2017**, 1-5 (2017).
<http://gavinpublishers.com/induction-of-drug-resistance-in-human-hepatoma-cells-cultured-on-a-silicate-fiber-based-3d-scaffold/>

T. Iwasa, R. Watanabe, K. Sasaki, T. Matsushita, A. Yamaguchi, M. Kawabe, A culture method of rat hepatocytes using the three-dimensional cell culture scaffold "Cellbed" and its application for liver toxicity testing, *AATEX*, 査読有, **21**, 52-56 (2016).

T. Matsushita, Application of 3D culture for human cells as an alternatives to animal experiments, *AATEX*, 査読有, **21**, 50-51 (2016).

T. Ishii, H. Saito, Y. Komizu, R. Tomoshige, T. Matsushita, Effects of macroporous hydroxyapatite carriers on the growth and function of human hepatoblasts derived from fetal hepatocytes, *J. Biosci. Bioeng.*, 査読有, **122**, 240-245 (2016).

DOI: 10.1016/j.jbiosc.2016.01.012

T. Kubo, Y. Kuroda, S. Horiuchi, S.R. Kim, Y. Sekino, S. Ishida, Upregulations of metallothionein gene expressions and tolerance to heavy metal toxicity by three dimensional cultivation of HepG2 cells on VECCELL 3-D inserts, *J. Toxicol. Sci.*, 査読有, **41**, 147-153 (2016).

DOI:org/10.2131/jts.41.147

T. Ishii, Y. Komizu, N. Shibuya, K. Kuasaka, T. Matsushita, Effects of the use of polyacrylonitrile nanofibers as 3D scaffolds on the growth and function of human hepatoblasts derived from fetal hepatocytes, *AATEX*, 査読有, **20**, 66-72 (2015).

DOI:10.11232/aatex.20.66

H. Dubois-Pot-Schneider, K. Fekir, C. Coulouarn, D. Glaise, C. Aninat, K. Jarnouen, R. Le Guével, T. Kubo, S. Ishida, F. Morel, A. Corlu, Inflammatory cytokines promote the retrodifferentiation of tumor-derived hepatocyte-like cells to progenitor cells, *Hepatology*, 査読有, **60**, 2077-2090 (2014).

DOI:10.1002/hep.27353

S.-R. Kim, T. Kubo, Y. Kuroda, M. Hojyo, T. Matsuo, A. Miyajima, M. Usami, Y. Sekino, T. Matsushita, S. Ishida, Comparative metabolome analysis of cultured fetal and adult hepatocytes in humans, *J. Toxicol. Sci.*, 査読有, **39**, 717-723(2014).

DOI:10.2131/jts.39.717

[学会発表](計 23 件)

稲村 恒亮、古水 雄志、松本 陽子、松下 琢「ハイブリッドリポソームを用いた腫瘍原性幹細胞の選択的排除に関する研究」2017年3月7日、第16回日本再生医療学会総会、仙台国際センター(宮城県仙台市)

古水 雄志、中村 茉耶、大田 裕也、水民 敬浩、岩佐 卓哉、佐々木 皓平、渡邊 理恵、川部 雅章、松下 琢「三次元培養担体 Cellbed を用いた肝臓がん細胞の薬剤耐性現象の再現と薬剤耐性克服薬スクリーニングへの応用」2017年1月31日、細胞アッセイ研究会シンポジウム【細胞アッセイ技術の現状と将来】、東京大学生産技術研究所コンベンションホール(東京都目黒区)

長崎 花佳、稲村 恒亮、水民 敬浩、石井 貴晃、古水 雄志、岩佐 卓哉、佐々木 皓平、渡邊 理恵、川部 雅章、松下 琢「三次元培養担体 Cellbed を用いたヒト凍結肝細胞の機能発現および維持培養における評価」2016年11月18日、第29回日本動物実験代替法学会、九州大学百年講堂(福岡県福岡市)

白木 明日香、市川 雄大、稲村 恒亮、水民 敬浩、古水 雄志、石田 誠一、金 秀良、関野 祐子、松下 琢「胎児肝細胞及び成人肝細胞のメタボローム解析と化学物質毒性発現の比較解析(第三報)」2016年11月18日、第29回日本動物実験代替法学会、九州大学百年講堂(福岡県福岡市)

中村 茉耶、大田 裕也、水民 敬浩、古水 雄志、岩佐 卓哉、佐々木 皓平、渡

邊 理恵、川部 雅章、松下 琢「三次元培養担体 Cellbed を用いた肝がん細胞の薬剤耐性現象の再現と薬剤耐性克服薬スクリーニングへの応用(第二報)」2016年11月17日、第29回日本動物実験代替法学会、九州大学百年講堂(福岡県福岡市)

松下 琢「ヒト細胞三次元培養の代替法としての可能性」2016年11月16日、第29回日本動物実験代替法学会、九州大学百年講堂(福岡県福岡市)

T. Mizutami, Y. Ohta, Y. Komizu, T. Matsushita「Screening of the drugs to overcome drug resistance of human hepatoma HepG2 cells by using three-dimensional culture」2016年10月24日-2016年10月26日, 17th International Biotechnology Symposium (IBS), Melbourne Convention Centre (Melbourne, Australia)

穴田 春奈、中村 茉耶、大田 裕也、水民 敬浩、古水 雄志、松下 琢「ヒト肝がん細胞三次元培養の薬剤耐性克服薬スクリーニングへの応用」2016年7月2日、第53回化学関連支部合同九州大会、北九州国際会議場(福岡県北九州市)

稲村 恒亮、水民 敬浩、古水 雄志、松本 陽子、上岡 龍一、松下 琢「ハイブリッドリポソームを用いた腫瘍原性肝幹細胞の選択的排除に関する研究」2016年3月19日、第15回日本再生医療学会総会、大阪国際会議場(大阪府大阪市)
古水 雄志、大田 裕也、水民 敬浩、松本 陽子、松下 琢「ハイブリッドリポソームの肝臓がん細胞に対する薬剤耐性克服薬としての応用」2016年2月19日、国際高等研究所研究プロジェクト分子基盤に基づく生体機能への揺らぎとダイナミックネットワークの解明(招待講演)、国際高等研究所(京都府木津川市)

市川 雄大、松下 琢、石井 貴晃、古水 雄志、金 秀良、石田 誠一、宮島 敦子、関野 祐子「胎児肝細胞及び成人肝細胞のメタボローム解析と化学物質毒性発現の比較解析(第二報)」2015年12月11日、日本動物実験代替法学会第28回大会、ワークピア横浜(神奈川県横浜市)

大田 裕也、水民 敬浩、古水 雄志、岩佐 卓哉、佐々木 皓平、渡邊 理恵、川部 雅章、松下 琢「三次元培養担体 Cellbed®を用いた肝がん細胞の薬剤耐性現象の再現と薬剤耐性克服薬スクリーニングへの応用」2015年12月11日、日本動物実験代替法学会第28回大会、ワークピア横浜(神奈川県横浜市)

石井 貴晃、古水 雄志、岩佐 卓哉、佐々

木 皓平、渡邊 理恵、川部 雅章、松下 琢「三次元細胞培養担体 Cellbed®を用いたヒト凍結肝細胞の維持培養」2015年12月11日、日本動物実験代替法学会第28回大会、ワークピア横浜(神奈川県横浜市)

T. Mizutami, Y. Ohta, Y. Komizu, T. Matsushita「Screening of the agents to overcome drug resistance of human hepatoma HepG2 cells by using three-dimensional culture」2015年11月22日、The 4th International Symposium, Dynamical ordering of biomolecular systems for creation of integrated functions, Nishijin Plaza, Kyushu University (Fukuoka-shi, Japan)

松下 琢「中空系膜型三次元細胞培養モジュールを用いたヒト肝細胞の長期培養の実現」2015年7月30日、第45回繊維学会夏季セミナー(招待講演)、北九州国際会議場(福岡県北九州市)

石井 貴晃、古水 雄志、松下 琢、柳 麻美子、生田 健次郎、日下 孝司「ヒト肝臓細胞の中空系膜型三次元培養モジュールを用いた長期培養と毒性評価への応用」2015年6月27日、第52回化学関連支部合同九州大会、北九州国際会議場(福岡県北九州市)

石井 貴晃、松下 琢、古水 雄志、柳 麻美子、生田 健次郎、日下 孝司「肝臓機能の維持を目指した中空系膜型三次元培養モジュールを用いたヒト肝細胞の長期培養」2015年3月20日、第14回日本再生医療学会総会、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

市川 雄大、石井 貴晃、古水 雄志、松下 琢、金 秀良、石田 誠一、宮島 敦子、関野 祐子「胎児及び成人肝細胞のメタボロームと化学物質毒性発現の比較解析」2014年12月7日、日本動物実験代替法学会第27回大会、横浜国立大学(神奈川県横浜市)

石井 貴晃、松下 琢、古水 雄志、柳 麻美子、生田 健次郎、日下 孝司「毒性評価への応用を目指した中空系膜型三次元細胞培養モジュールを用いたヒト肝細胞の長期培養」2014年12月7日、日本動物実験代替法学会第27回大会、横浜国立大学(神奈川県横浜市)

20 水民 敬浩、大田 裕也、石井 貴晃、古水 雄志、松下 琢「ヒト肝臓がん細胞の三次元培養による薬剤耐性克服薬のスクリーニングへの応用」2014年12月7日、日本動物実験代替法学会第27回大会、横浜国立大学(神奈川県横浜市)

21 金 秀良、久保 崇、黒田 幸恵、北条 麻紀、宮島 敦子、松下 琢、関野 祐子、石田 誠一「ヒト胎児および成人肝細胞のメタボローム解析による基礎代

謝機能と関連する遺伝子発現の比較解析」2014年10月4日、第58回日本薬学会関東支部大会、昭和薬科大学（東京都町田市）

- 22 T. Matsushita, T. Ishii, N. Shibuya, K. Ikuta, K. Kusaka 「Development of hollow fiber type three dimensional (3D) culture module for long term culture of human hepatocytes to evaluate the drug toxicity to liver」2014年8月25日、The 9th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, Hotel Hilton Prague (Prague, Czech Republic)
- 23 石田 誠一、金 秀良、久保 崇、黒田 幸恵、北条 麻紀、宮島 敦子、松下 琢、関野 祐子「ヒト胎児肝細胞と成人肝細胞における基礎代謝機能と関連する遺伝子発現の比較解析」2014年7月3日、第41回日本毒性学会学術年会、神戸コンベンションセンター（兵庫県神戸市）

〔その他〕

ホームページ等

<http://rsrch.ofc.sojo-u.ac.jp/sjuhp/KgApp?kyoinId=ymkbgigy>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松下 琢 (MATSUSHITA Taku)
崇城大学・生物生命学部・教授
研究者番号：10209538

(2) 研究分担者

石田 誠一 (ISHIDA Seiichi)
国立医薬品食品衛生研究所・薬理部・室長
研究者番号：10270505

(3) 研究分担者

古水 雄志 (KOMIZU Yuji)
崇城大学・生物生命学部・助教
研究者番号：80735829