

細胞非接着性表面処理による 3 次元培養基板を用いたヒト初代肝細胞機能評価

高橋 由里子, 城村 友子, 小関 恵美子, 池谷 武志
(株式会社 トランスパレント)

《目的》

初代肝細胞培養は創薬研究など医学生物学研究に欠かせない技術だが、従来の単層培養は形態的にも機能的にも十分に *in vivo* の状態を反映しているとはいえない。近年、肝細胞の機能維持に優れた培養系として 3 次元スフェロイド培養が注目されている。3 次元培養用基板の一つ、細胞アレイはウェル底面に高分子表面処理を施し、細胞接着領域と非接着領域とをパターン化した培養システムである。また、フィーダー細胞との共培養を行うことによってさらに安定した機能維持を現出している。本研究では手術摘出肝組織から分離した初代ヒト肝実質細胞または凍結肝実質細胞を細胞アレイで培養し、薬物動態研究で必要とされる代謝・抱合・取込・排泄活性について、培養下での機能維持の観点から検討を行った。

《方法》

新鮮ヒト肝実質細胞は、国立成育医療研究センターにおける生体肝移植時にドナー肝組織が過大な場合の縮小化処置で得られる余剰肝組織から分離した (倫理審査 No.385, 396)。凍結ヒト肝実質細胞は Xenotech 社より購入した。3 次元培養には細胞アレイ (Cell-able, トランスパレント) を用いた。対照としてコラーゲンコートプレート (セルタイト, 住友ベークライト) を用いた。細胞アレイ培養では予めフィーダー細胞としてマウス線維芽細胞 (JCRB 9019 又は ATCC CCL-163) を培養した Cell-able に、ヒト肝実質細胞を 4×10^4 cells / well (96 well type), 4×10^5 cells / well (12 well type) 播種した。対照のコラーゲンコートプレート培養ではフィーダー細胞は用いなかった。培地は Williams E 培地ベースで 1% 牛胎仔血清を含む RM101 (トランスパレント) を使用した。

1) テストステロン代謝能測定

新鮮ヒト肝実質細胞培養 3, 7 日目に基質として Teststerone を 100 micro-mol/L となるよう添加, 4 時間反応後上清中の代謝物 6beta-hydroxy testosterone (6OHTS), Testosterone glucuronide (TSGln) を UPLC (Waters) で測定した。

長期培養試験では凍結肝実質細胞を 54 日目まで培養し, 7, 14, 54 日目に上述の Testosterone 代謝活性を測定した。薬物代謝酵素誘導は rifampicin (25 micro-mol/L) を培地に添加し 3 日間培養した。

2) 取り込みトランスポーター試験 (uptake)
新鮮肝実細胞を用い, 分離直後, 培養後 3,7 日に基質として $[^3\text{H}(\text{G})]$ -Taurocholic acid (PerkinElmer 社) 1 micro-mol/L を加え 2, 5, 10 min 反応させた。その後未反応基質を洗浄, 除去し, 細胞が取り込んだ基質量を液体シンチレーションカウンターによって測定した。

3) 胆管腔構造の確認による排泄機能評価新鮮肝実質細胞を播種, 培養し, 2,4,7 日後に,

5(6)-carboxy-2',7'-dichlorofluorescein Diacetate (以下 CDF-DA) を添加し, 37°C, 10min 反応させた. 生細胞内で生成・排泄された CDF を共焦点レーザー顕微鏡 (オリンパス) にて観察した.

《結果》

1) テストステロン代謝能測定
新鮮肝実質細胞を播種した場合, 培養 1 日目においてスフェロイドが形成され, その後日数を経るごとにしっかりとしたスフェロイド形態をとるようになっていった. 培養 3,7 日目の 6OHTS 活性はそれぞれ 3.9 pmol/10⁶ cells/min, 4.0 pmol/10⁶ cells/min であった. TSGln 活性は 1.7 pmol/10⁶ cells/min, 1.8 pmol/10⁶ cells/min であった.

凍結肝実質細胞を用いた場合, 培養 3 日目にスフェロイドが形成された. 培養 7, 14, 54 日目の 6OHTS 活性は, 180 pmol/10⁶ cells/min, 195 pmol/10⁶ cells/min, 150 pmol/10⁶ cells/min と, 良好に維持された. また, rifampicin による誘導試験では 54 日目においても 5 倍 (800 pmol/10⁶ cells/hr) の誘導が確認できた.

2) 取り込みトランスポーター試験 (uptake)

初期活性は 24.1 nmol/10⁶ cells であった. 3次元培養では培養 3 日目で 2.84 nmol/10⁶ cells, 培養 7 日目で 6.83nmol/10⁶ cells を示したが, 単層培養では培養 3 日目で 0.49nmol/10⁶ cells となり, 極めて低かった.

3) 胆管腔構造の確認による排泄機能評価

2, 4, 7 日と経過するにともない, 肝細胞間に管腔様構造と思われるスポットを強く確認することができた. これらのスポットは, Ca²⁺非存在下において消失した. 従ってこのスポットは細胞間隙に存在する bile pool と考えられた.

Cell-able を用いたヒト肝実質細胞の 3次元培養は, 単層培養に比べ, 薬物動態・毒性研究に必要な種々の肝機能の維持に優れることがわかった. Cell-able は 100 ミクロン径のスフェロイドを規則的に配列できるよう表面加工がなされている. このため, 少数の肝細胞でも良好な高密度 3次元培養が可能となる. また, フィーダー細胞として血管内皮細胞を用いた場合, ディッセ腔様構造を有する人工肝小葉を構築することがわかっている. これらより, 3次元培養と非実質細胞の混合培養の組み合わせはトランスポーター機能を含めた肝機能全般の発現, 維持に寄与している可能性がある. 以上より, Cell-able は, 貴重かつ稀少な研究資源であるヒト肝細胞の利活用に極めて有用なツールであると考えられる.