

キメラマウス由来肝細胞の三次元培養 ～PXB-able™とヒト初代肝細胞の三次元長期培養におけるCYP酵素誘導活性の経時変化～

○城村友子¹⁾, 赤平有希¹⁾, 山崎ひろ²⁾, 石田雄二²⁾³⁾, 立野知世²⁾³⁾
1) 東洋合成工業株式会社 2) 株式会社フェニックスバイオ 3) 広島大学 肝臓プロジェクト研究センター

Introduction

近年、Cell-Based Assayは従来の二次元培養法から、より生体内を反映すると思われる三次元培養法にシフトする傾向にある。欧州実験動物代替学会 (ECVAM)においても、「長期間、安定に培養できる培養技術・ツールの開発が現在の*in vitro*システムの大きな課題である。三次元培養、共培養が推奨される。」と報告があった¹⁾。これまでに三次元培養プレート (Cell-able®, 東洋合成工業) で作製された初代肝細胞スフェロイドは長期間肝特異的機能を維持し、肝毒性評価系として有用なツールであることが示されてきた²⁾³⁾。しかし、ヒト初代肝細胞は肝毒性評価系におけるゴールドスタンダードとされる一方、ドナー間差や供給に限りがあるなど大きな制約があった。このような制約を解決する手段として、我々はキメラマウス (PXBマウス®) 由来新鮮ヒト肝細胞 (PXB-cells®, 株式会社フェニックスバイオ) をCell-able®三次元培養プレート上でスフェロイド培養する、新たな*in vitro*システムPXB-able™を構築した。これまでにPXB-able™に於いては、スフェロイド断面TEM写真より肝微小構造が再構築され、肝特異的機能を維持して2か月間培養可能であることが判っている⁴⁾。今回我々はPXB-able™の長期培養を実施し、スフェロイドの形態、アルブミン産生能やCYP酵素の基礎活性・誘導活性の経時変化などについて凍結ヒト初代肝細胞と比較することにより、ヒト初代肝細胞の三次元培養系の代替手段としてのPXB-able™の可能性を検討した。

Materials and Methods

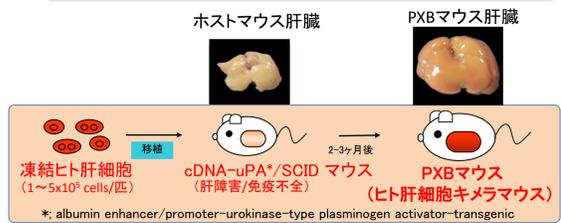
【Cell-able®とは】 TOYO GOSEI

Cell-able®とは、東洋合成工業(株)で製造・販売している三次元培養用マルチウェルプレートである。培養用マイクロプレートの培養表面を特殊な感光性ポリマーで微細加工しており、二次元培養に近い簡単な操作で均一なスフェロイド形成を可能にしている。肝細胞をはじめ、様々な接着性細胞のスフェロイド培養に利用されている。



【PXB-cells®とは】 PhoenixBio

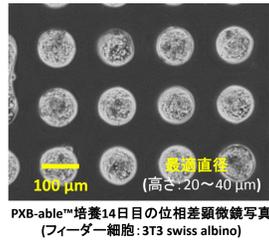
PXB-cells®とは、株式会社フェニックスバイオで安定生産しているPXBマウス® (ヒト肝細胞キメラマウス) から分離した新鮮ヒト肝細胞である。現在、PXB-cells®は薬物代謝試験やHBVの持続感染試験などの様々な分野で利用されている。



【培養条件】

肝細胞播種1日前に3T3 swiss albinoを播種したのち、翌日凍結ヒト初代肝細胞或いはPXB-cells®を三次元培養パターンニングプレート (Cell-able® 96-well plate) 上に30,000 cells/wellで播種した。培地はRM-101培地 (東洋合成工業) を用い、ヒト初代肝細胞は2~3日毎、PXB-cells®は3~4日毎に培地交換を行った。

培養条件概要	
培養器材	Cell-able® 96-well plate
フィーダー細胞	3T3 swiss albino (マウス繊維芽細胞)
肝細胞	凍結ヒト初代肝細胞 (Human) ヒト肝細胞キメラマウス (PXBマウス®) 由来ヒト肝細胞 (PXB-cells®)
培地	RM-101 (東洋合成工業)



【アルブミン分泌能測定】

培養上清をヒトアルブミン測定ELISA Kit (Bethyl, 米国) にて測定

【アルブミン産生能測定】

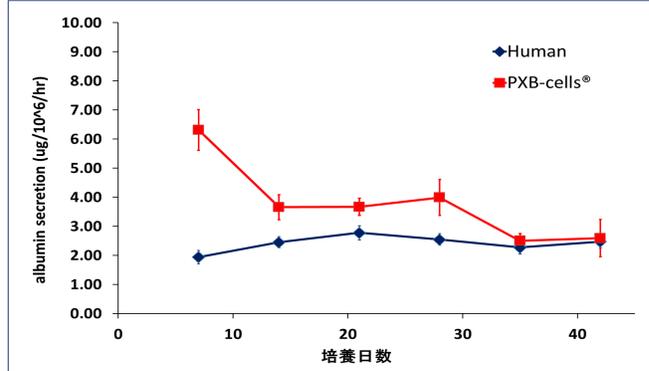


Fig.2: アルブミン産生能グラフ
凍結ヒト初代肝細胞とPXB-cells®をCell-able®を用いて培養し、7, 14, 21, 28, 35, 44日目の培養上清中のアルブミン濃度を測定し経時変化を比較した。その結果、ヒト初代肝細胞、PXB-cells®細胞共にCell-able®三次元培養で、6週間以上安定したアルブミン産生能を示した。

【CYP1A2, CYP2C9, CYP3A4活性測定, 誘導試験】

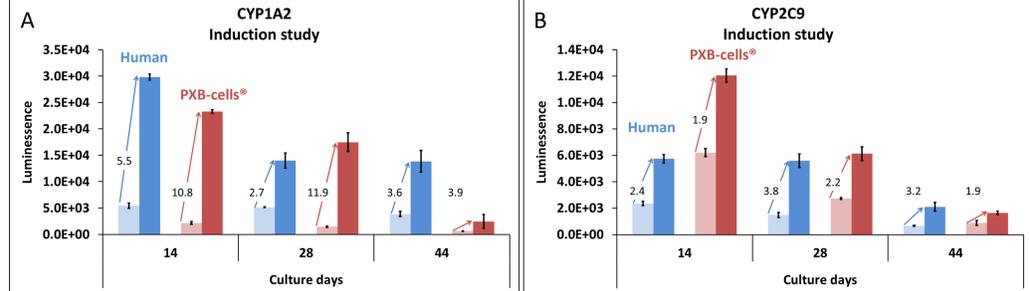
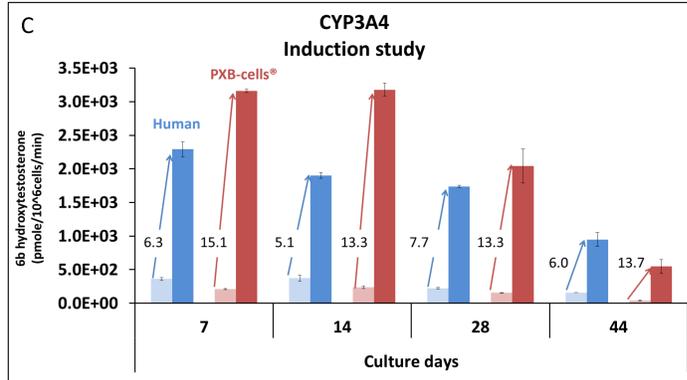


Fig.3: 誘導前後の活性比較
A: CYP1A2, B: CYP2C9, C: CYP3A4
凍結ヒト初代肝細胞とPXB-cells®をCell-able®上で長期培養し、CYP1A2, CYP2C9, CYP3A4の基礎活性と誘導後の活性の経時変化を比較した。両細胞ともCYP1A2, CYP2C9, CYP3A4活性が6週間以上認められ、更に誘導能も保持されていた。また、基礎活性、誘導後の活性値レベルは両細胞でほぼ同等であった。(グラフ内数値はfold of induction)



【CYP1A2, CYP2C9, CYP3A4誘導倍率/活性値と遺伝子発現】

CYP種	培養日数	活性値		遺伝子発現	
		Human	PXB-cells®	Human	PXB-cells®
CYP1A2	day7	NT	NT	29.6	28.6
	day14	5.5	10.8	72.6	119.8
	day28	2.7	11.9	37.9	170.1
	day44	3.6	3.9	26.1	488.2
CYP2C9	day7	NT	NT	3.3	1.1
	day14	2.4	1.9	3.9	2.6
	day28	3.8	2.2	13.6	1.7
	day44	3.2	1.9	6.8	8.7
CYP3A4	day7	6.3	15.1	9.8	17.8
	day14	5.1	13.3	15.4	50.2
	day28	7.7	13.3	65.9	31.6
	day44	6.0	13.7	25.0	167.6

NT: Not Tested

Table 1: CYP1A2, 2C9, 3A4における誘導倍率
凍結ヒト初代肝細胞とPXB-cells®における各CYP種の誘導倍率を活性値と遺伝子発現で比較した。活性値に関してはFig.3でも示した通り、培養期間を通じて両細胞とも誘導能が保持されていたが、遺伝子発現に関しても培養期間を通じて誘導能が保持されていることが確認された。

【CYP1A2, CYP2C9, CYP3A4活性測定, 誘導試験】

- > CYP1A2活性測定
 - ①誘導群は活性測定前に25 μM β-naphthoflavoneを添加した培地で72時間培養。
 - ②P450-Glo™ CYP1A2 (プロメガ)の取扱説明書に従い、Non-lytic AssayでCYP1A2活性を測定した。
- > CYP2C9活性測定
 - ①誘導群は活性測定前に20 μM Rifampicinのを添加した培地で72時間培養。
 - ②P450-Glo™ CYP2C9 (プロメガ)の取扱説明書に従い、Non-lytic AssayでCYP2C9活性を測定した。
- > CYP3A4活性測定
 - ①誘導群は活性測定前に20 μM Rifampicinを添加した培地で72時間培養。
 - ②培養上清を除去し、洗浄後100 μMのTestosteroneを基質としてwellに添加し2時間反応後、上清を回収。
 - ③上清をHPLCを用いて分析し、上清中の6β-hydroxytestosteroneの濃度を定量することによりCYP3A4の活性を測定した。

【CYP1A2, CYP2C9, CYP3A4 遺伝子発現】

- ①培養ウェルにTRIzol® Reagentを添加してスフェロイドを溶解し、RNAを回収。
- ②Direct-zol RNA Mini Prep (Zymo research)でRNAを抽出後にSuperscript III Reverse Transcriptase (Lifetechnologies)で逆転写を行い、ヒト特異的なPrimer setを用いてReal-Time PCR (ABI 7500, Applied Biosystems)で解析。

【参考: PXB-able™におけるスフェロイドの形態と肝微小構造の再構築】

> スフェロイド側面からのSEM写真

PXB-able™スフェロイド側面からのSEM写真。高さ約40 μmの山状の形態をしていることが確認された。(肝細胞播種後10日目)

撮影協力: 日本電子株式会社
撮影装置: InTouchScope

> スフェロイド断面のTEM写真

PXB-able™スフェロイド断面のTEM写真。細胞接着装置の発達を伴う毛細胆管や微絨毛など、肝細胞に特徴的な極性を持った微細構造が再構築されていることが確認された。(肝細胞播種後10日目, RM-101培地使用)
(データ監修: 旭川医科大学 医学部 病理学講座腫瘍病理分野 西川祐司教授)

PXB-able™培養10日目の側面 SEM写真 (フィーダー細胞: 3T3 swiss albino)

Results

【形態の経時変化】

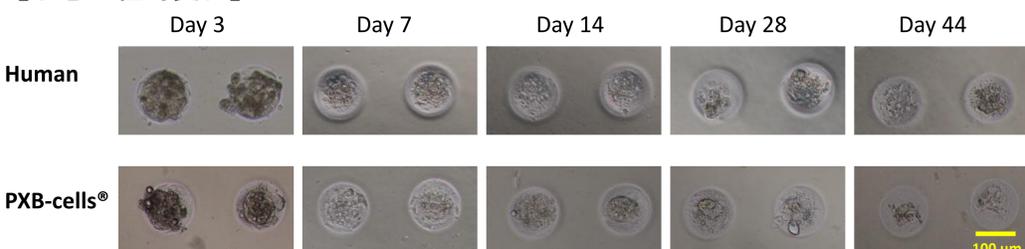


Fig. 1: 位相差顕微鏡写真

凍結ヒト初代肝細胞とPXB-cells®をCell-able®上で培養し、経時的形態変化を比較した。両細胞とも細胞播種3日後のスフェロイドは個々の細胞が確認され、スフェロイド形成途上と考えられた。7日目には個々の細胞は確認されず、一つの凝集塊 (成熟したスフェロイド) を形成した。また、培養期間が長くなるにしたがってスフェロイドは徐々に小さくなる傾向が認められたが、6週間以上培養可能であった。

Conclusions

- > Cell-able®上で三次元培養したヒト初代肝細胞とPXB-cells®は、スフェロイドの形成過程から成熟期、減衰期と培養期間を通じて、同様の形態的特徴と推移を示した。
- > Cell-able®三次元培養に於いて、アルブミン分泌能は両細胞とも6週間以上安定しており、分泌レベルは同等であった。
- > P450酵素のうち、CYP1A2, CYP2C9, CYP3A4の基礎活性と誘導後の活性及び遺伝子発現をヒト初代肝細胞とPXB-cells®で比較した。その結果、Cell-able®三次元培養に於いては、6週間の培養期間を通じて両細胞とも今回検討した全てのCYP酵素活性は消失せず、誘導剤曝露後は活性の上昇が確認された。また、それぞれの活性値は、ほぼ同レベルであった。また、遺伝子発現に於いても培養期間を通じて誘導能が保持されていることが確認された。
- > 以上の結果より、今回検討した項目に関して、PXB-able™は、ヒト初代肝細胞の三次元培養系と同等の性質を持っていることが明らかになった。つまり、PXB-able™は、ヒト特有の代謝物を含めた化合物の肝毒性評価ツールとしてヒト初代肝細胞三次元培養系の代替となりうる可能性が示唆された。

Acknowledgements

本発表にあたり、ご助言・ご指導を頂いた下記各位に心より感謝申し上げます。
・旭川医科大学医学部 病理学講座腫瘍病理分野 西川 祐司 教授
・日本電子株式会社 高木 孝士 様、池谷 綾美 様

References

- 1) S. Coecke et al., ATLA, 1999, 27, 579-638.
- 2) T. Ohkura et al., Drug Metab. Pharmacokin., 2014, 29, 373-378.
- 3) T. Oghihara et al., Fund. Toxicol. Sci., 2015, 2, 41-48.
- 4) 2017年細胞アッセイ研究会, P-14.