

YIA-3

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

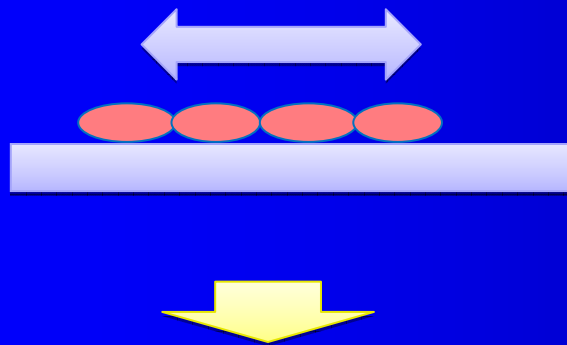
株式会社トランスパレント

○高橋由里子, 城村友子, 小関恵美子, 池谷武志

初代肝細胞培養における問題点

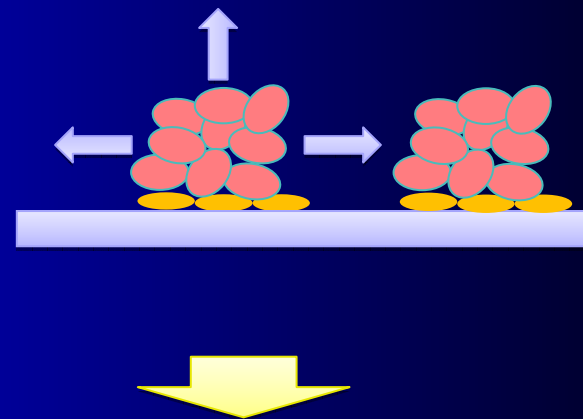
- 肝細胞活性を長期に維持できない
- 基材に接着しにくい(特に凍結肝細胞)

通常培養(2D)



生体内と環境が異なるため活性低下や接着不良が起こる可能性がある

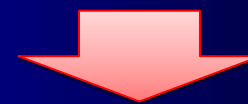
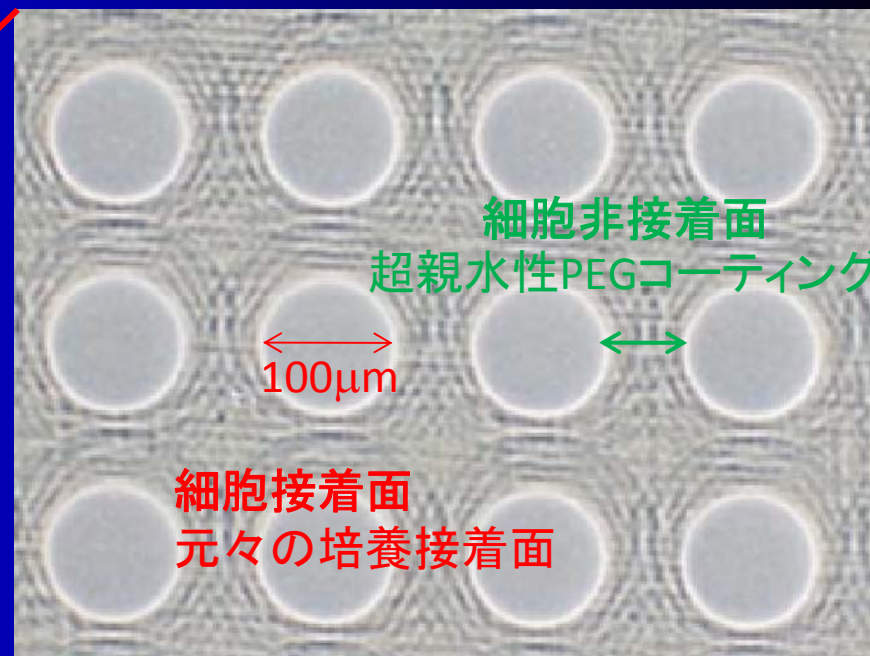
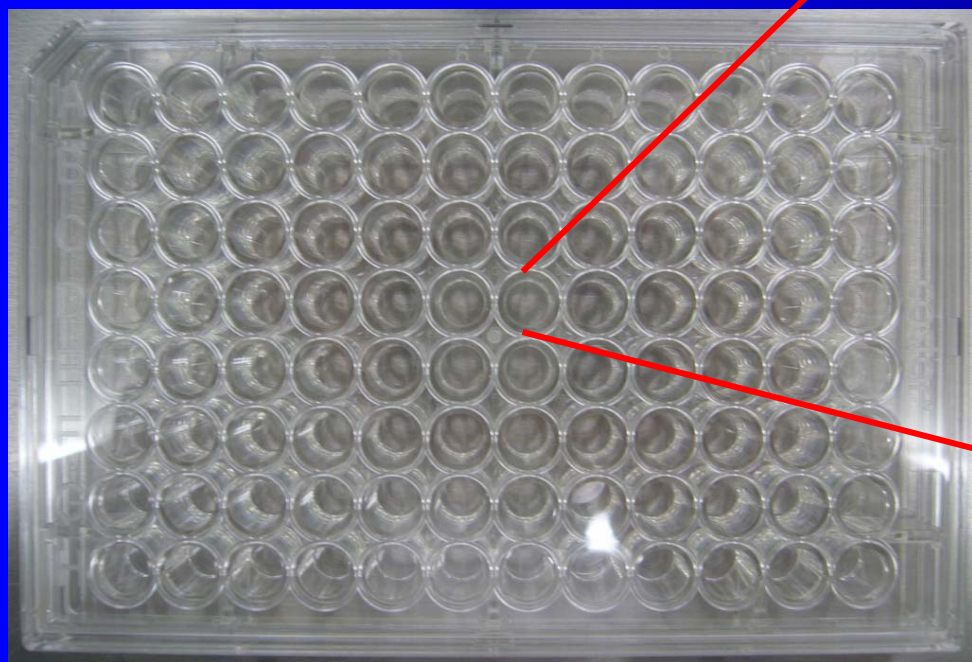
3次元培養(3D)



より生体内に類似した培養

3次元培養基板を用いて各種肝機能の評価をおこなった

細胞アレイ(Cell-able)について



細胞塊の大きさを制御

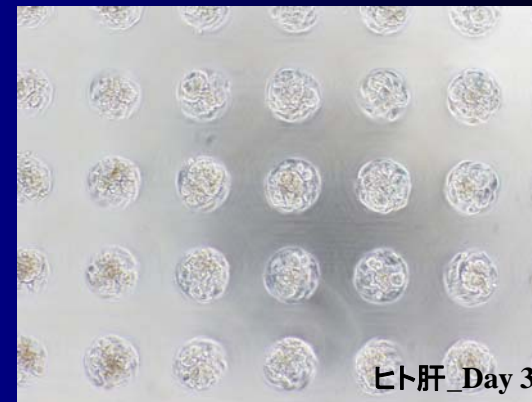
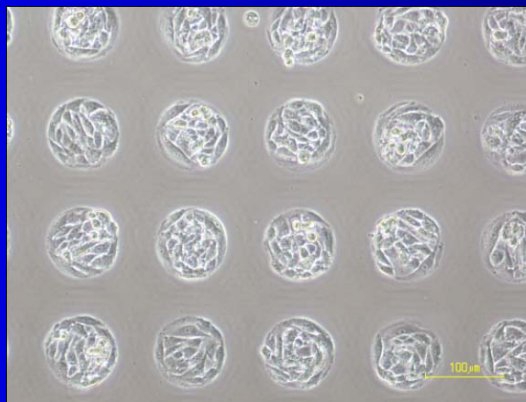
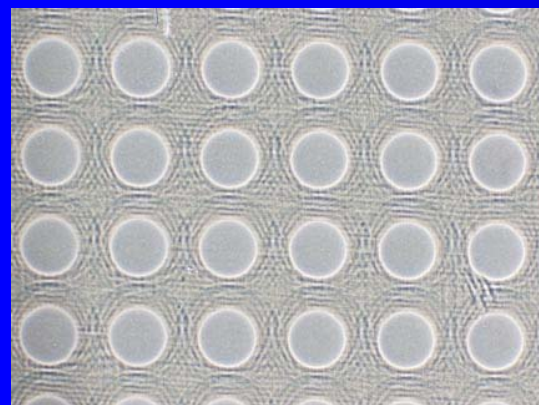
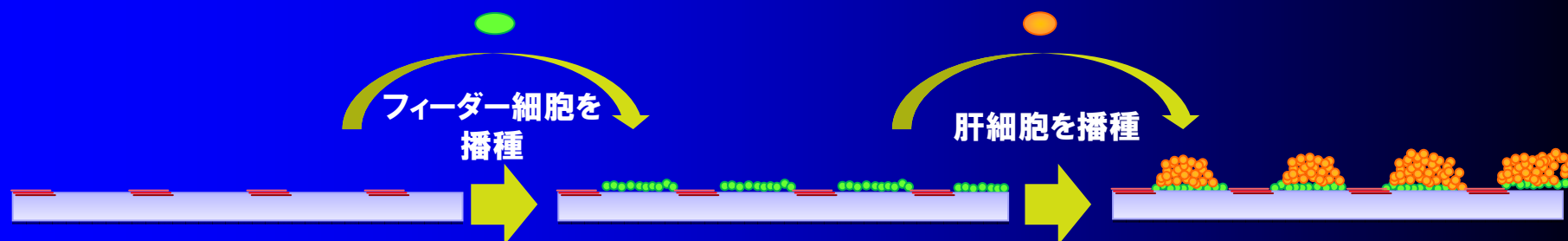
細胞アレイへの細胞の播種

- ・細胞塊の大きさを制御
- ・共培養

【細胞を播種する前】

【フィーダー細胞を播種】

【初代肝細胞を播種】



培養方法

| | |
|---------|--|
| 肝細胞 | 移植時余剰肝組織由来ヒト肝実質細胞 (倫理審査No.385, 396 国立成育医療研究センター) 凍結ヒト肝実質細胞(Xenotech社) ※補足データ取得のため |
| 細胞密度 | 96穴: 4×10^4 cells/well 12穴: 4×10^5 cells/well |
| フィーダー細胞 | マウス線維芽細胞 (JCRB 9019又はATCC CCL-163) |
| 培地 | RM101 (Williams E ベース, 1%ウシ胎仔血清含;トランスパレント社) |
| 培養基板 | 3D: 細胞アレイ(Cell-able) 2D: コラーゲンコートプレート |

検討項目

薬物代謝能及び誘導能の測定

基質 Testosterone(100 μ M 4h 曝露)

誘導剤 Rifampicin (75 μ M 72h 曝露)

取込トランスポーター試験

基質 Taurocholic acid, [3H(G)]- (1 μ M)

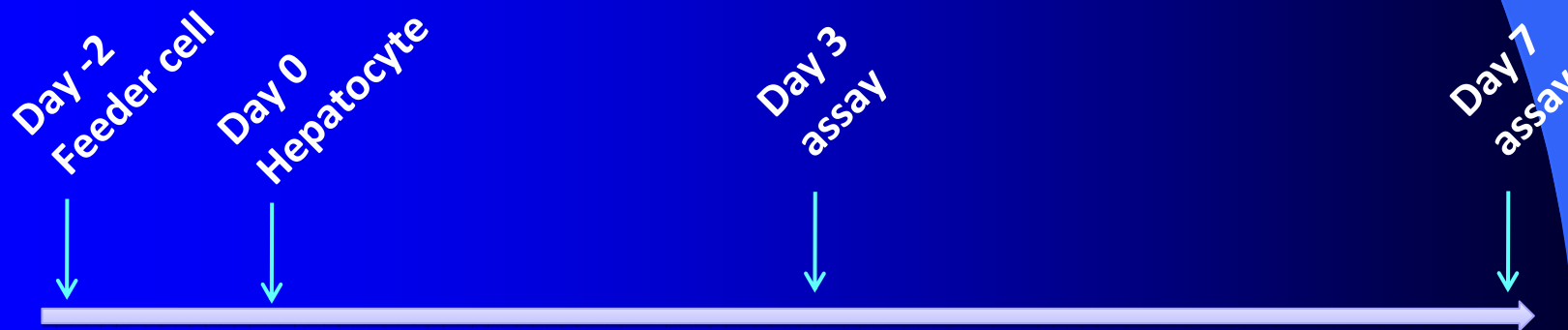
阻害剤 Rifamycin SV (100 μ M)

胆管腔様構造の確認

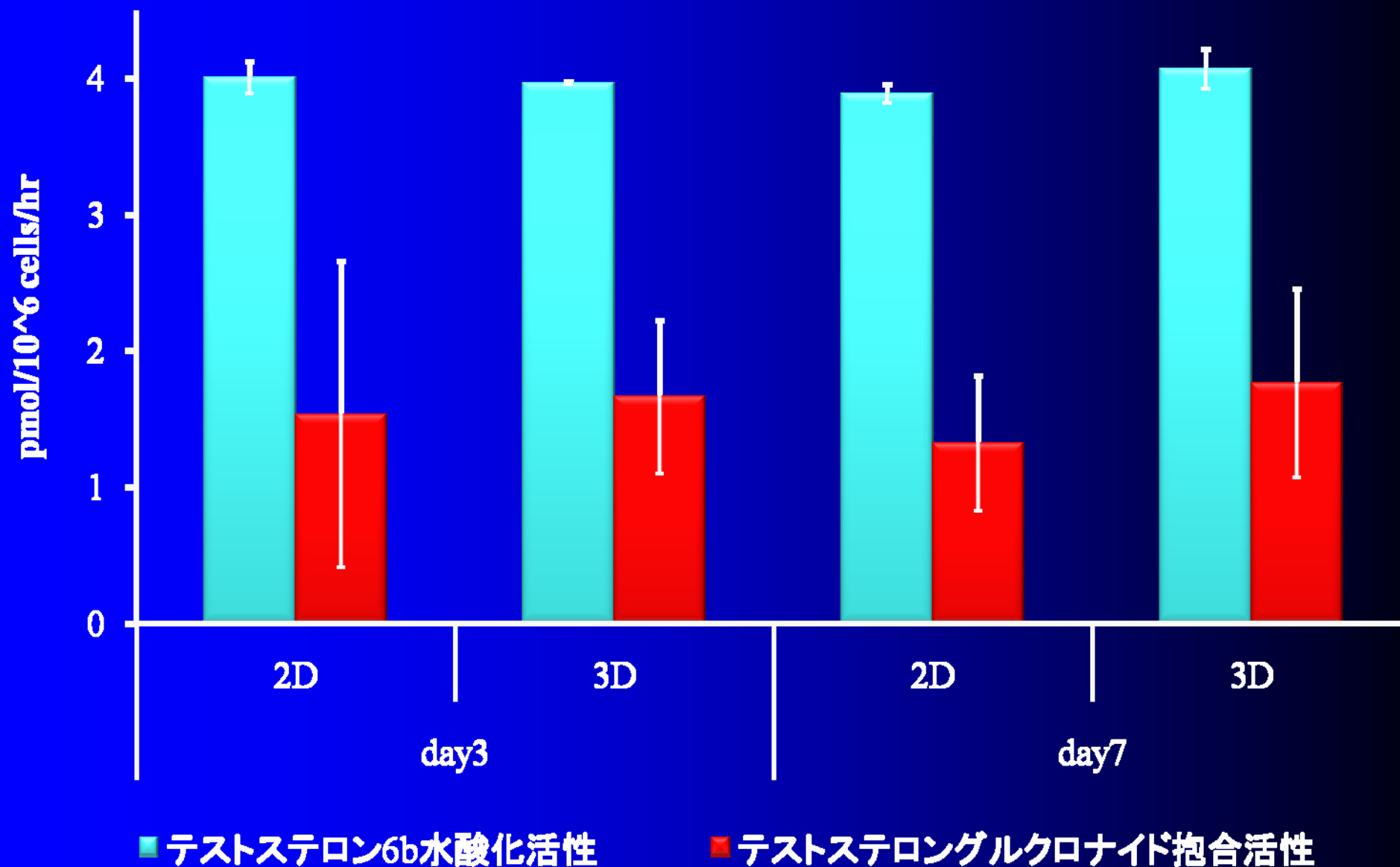
基質 5 (and 6)-Carboxy-2',7'-Dichlorofluorescein Diacetate(10 μ M)

1) テストステロン代謝能測定 - 短期培養試験 スケジュール

| | |
|--------|---|
| 肝細胞 | 移植時余剰肝組織由来ヒト肝実質細胞 (分離時細胞生存率: 82%) |
| 培養期間 | 7日間 |
| 基質 | Testosterone (100 μ M) |
| 反応時間 | 4時間 |
| 活性測定方法 | 第 I 相代謝酵素活性 (テストステロン6 β 水酸化活性) 第 II 相代謝酵素活性 (テストステロングルクロナイド抱合活性) |

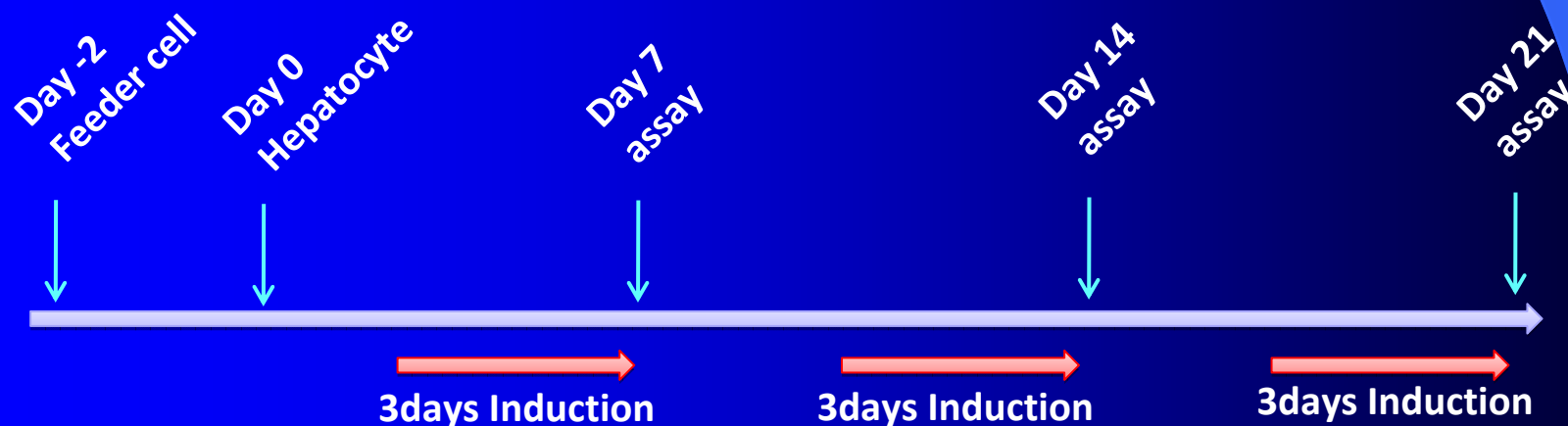


1) テストステロン代謝能測定-短期培養試験 結果



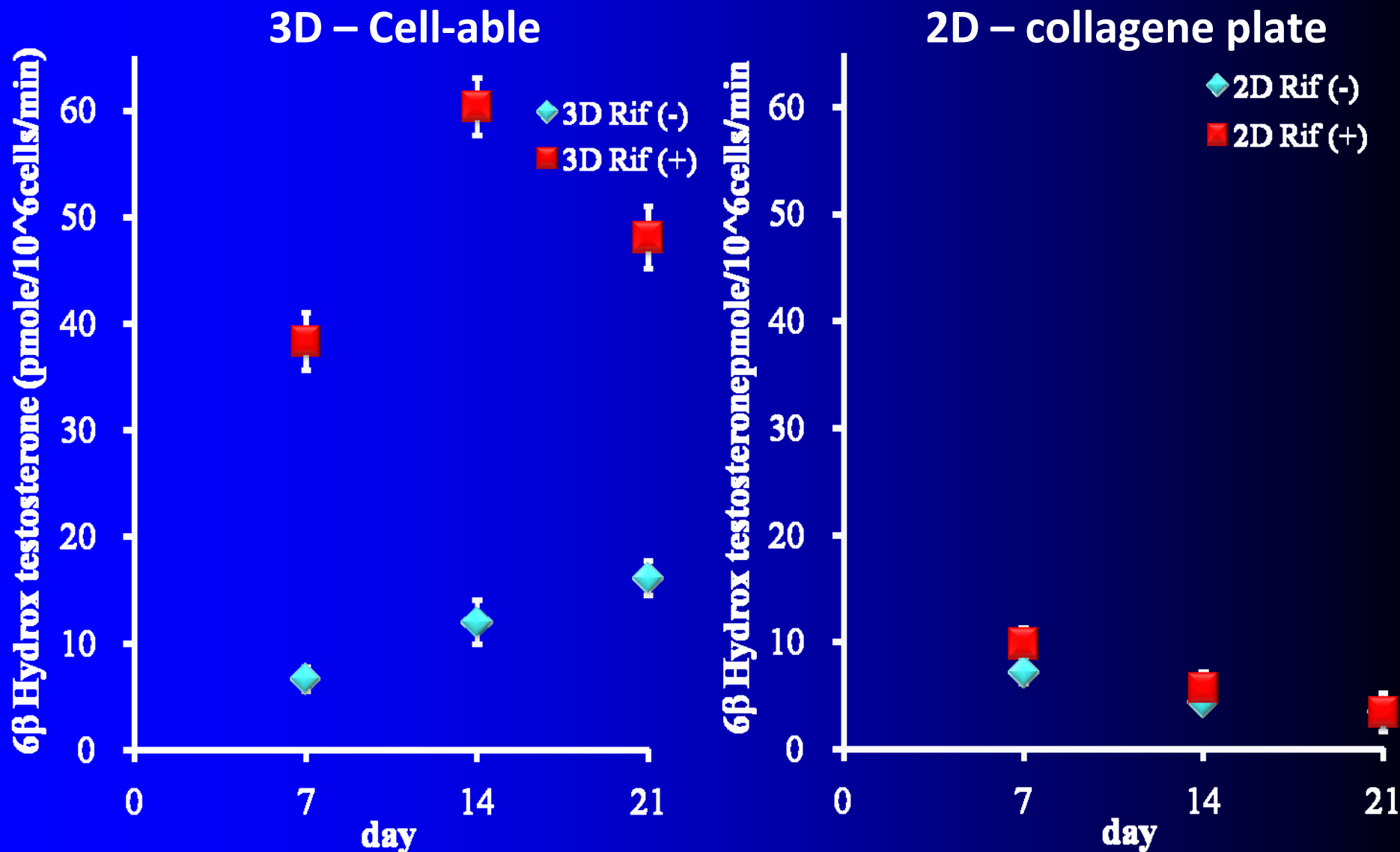
1) テストステロン代謝能測定 - 長期培養試験 スケジュール

| | |
|--------|---|
| 肝細胞 | 凍結初代肝実質細胞 lot. 799 (Xenotech社) |
| 培養日数 | 21日間 |
| 基質 | Testosterone (100 μ M) |
| 反応時間 | 4時間 |
| 誘導 | Rifampicin 75 μ M (72h) |
| 活性測定方法 | 第 I 相代謝酵素活性 (テストステロン6 β 水酸化活性) 第 II 相代謝酵素活性 (テストステロングルクロナイド抱合活性) |



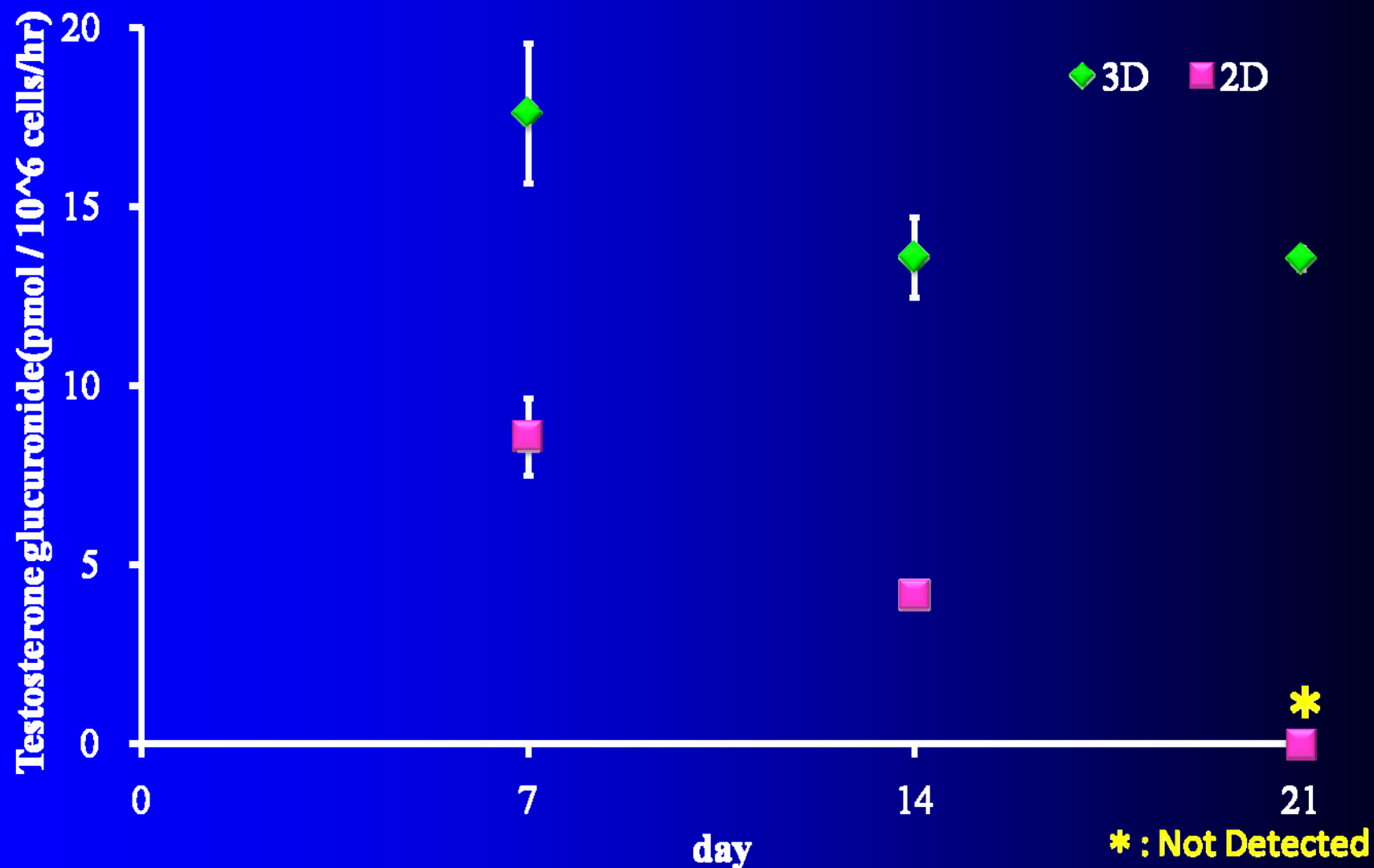
1) テストステロン代謝能測定 - 長期培養試験 結果

第 I 相代謝酵素活性 (テストステロン6 β 水酸化活性, 誘導活性)



1) テストステロン代謝能測定-長期培養試験 結果

第II相代謝酵素活性 (テストステロン グルクロナイド抱合活性)



1) テストステロン代謝能測定-長期培養試験 スケジュール

肝細胞

凍結ヒト肝実質細胞

lot. HC2-6 (unplateable, Xenotech)

lot. HC5-7 (plateable, Xenotech)

培養日数

54日間

基質

Testosterone (100 μ M)

反応時間

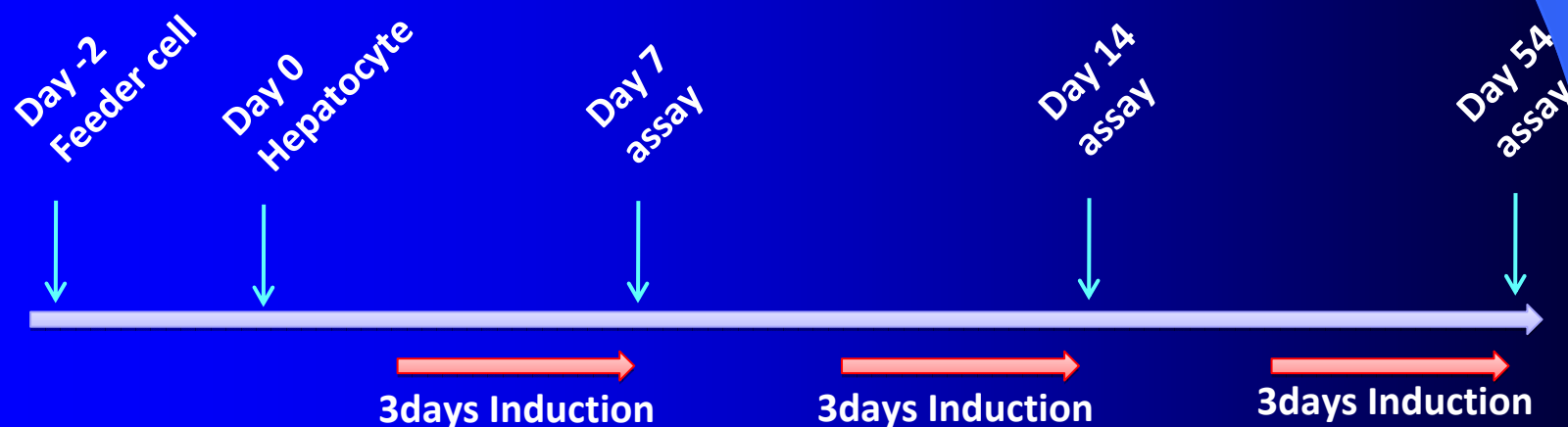
4時間

誘導

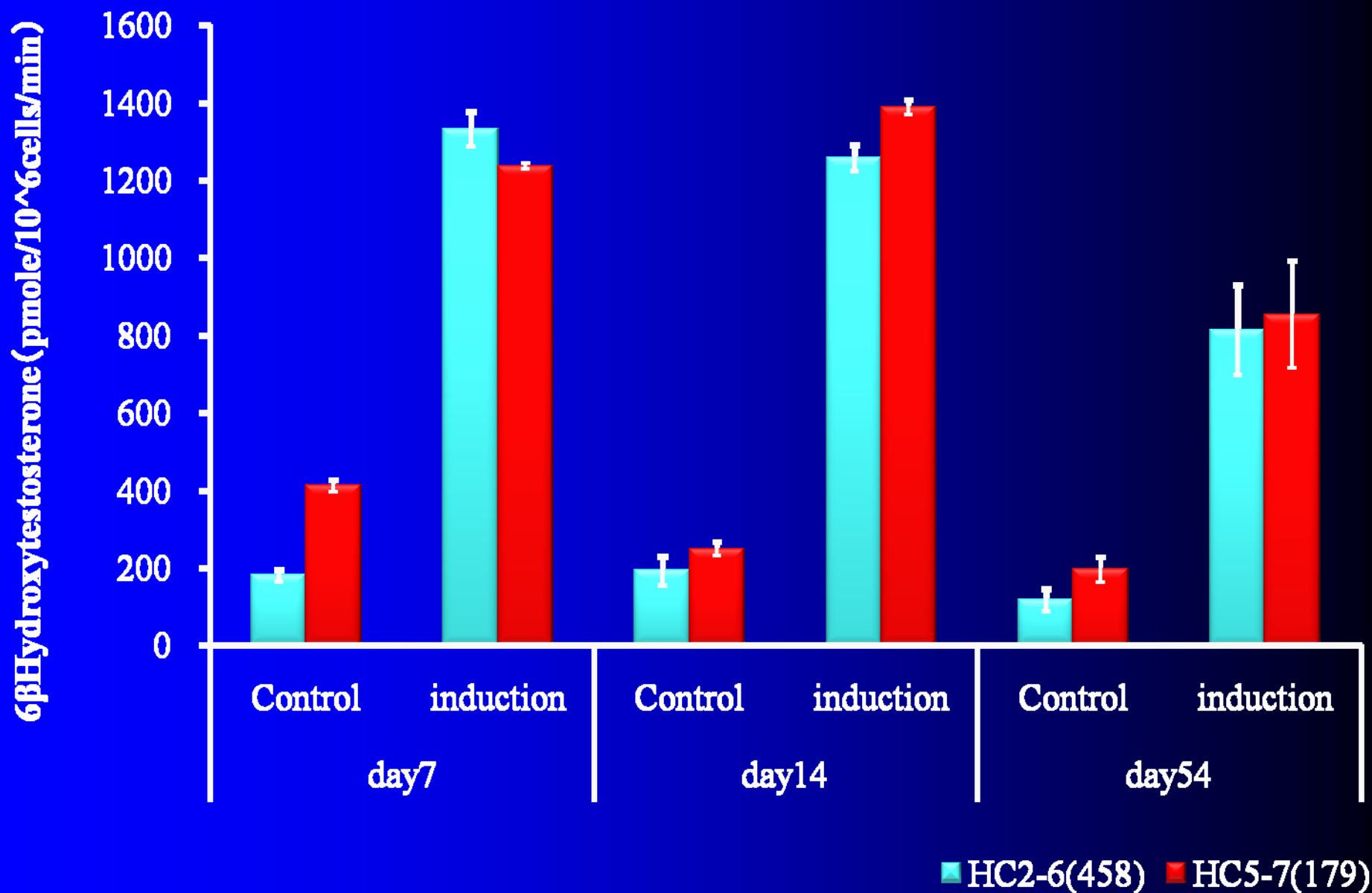
Rifampicin 75 μ M (3日間)

活性測定方法

第 I 相代謝酵素活性 (テストステロン6 β 水酸化活性)



1) テストステロン代謝能測定-長期培養試験 結果



2) 取込トランスポーター試験 スケジュール

肝細胞

移植時余剰肝組織由来ヒト肝実質細胞
(分離時細胞生存率: 82%)

基質

taurocholic acid, [$^3\text{H}(\text{G})$]- ($1\mu\text{M}$)

培養日数

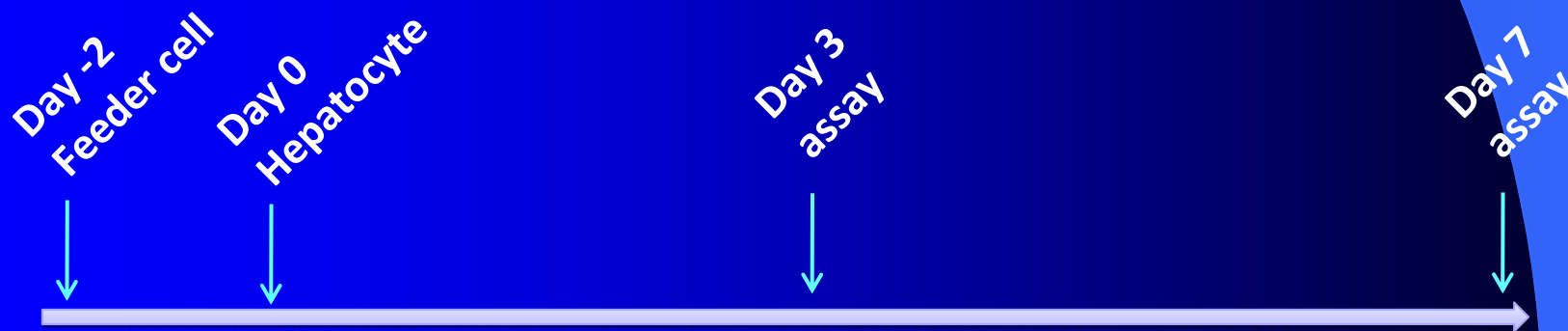
7日間

阻害剤

Rifamycin SV ($100\mu\text{M}$)

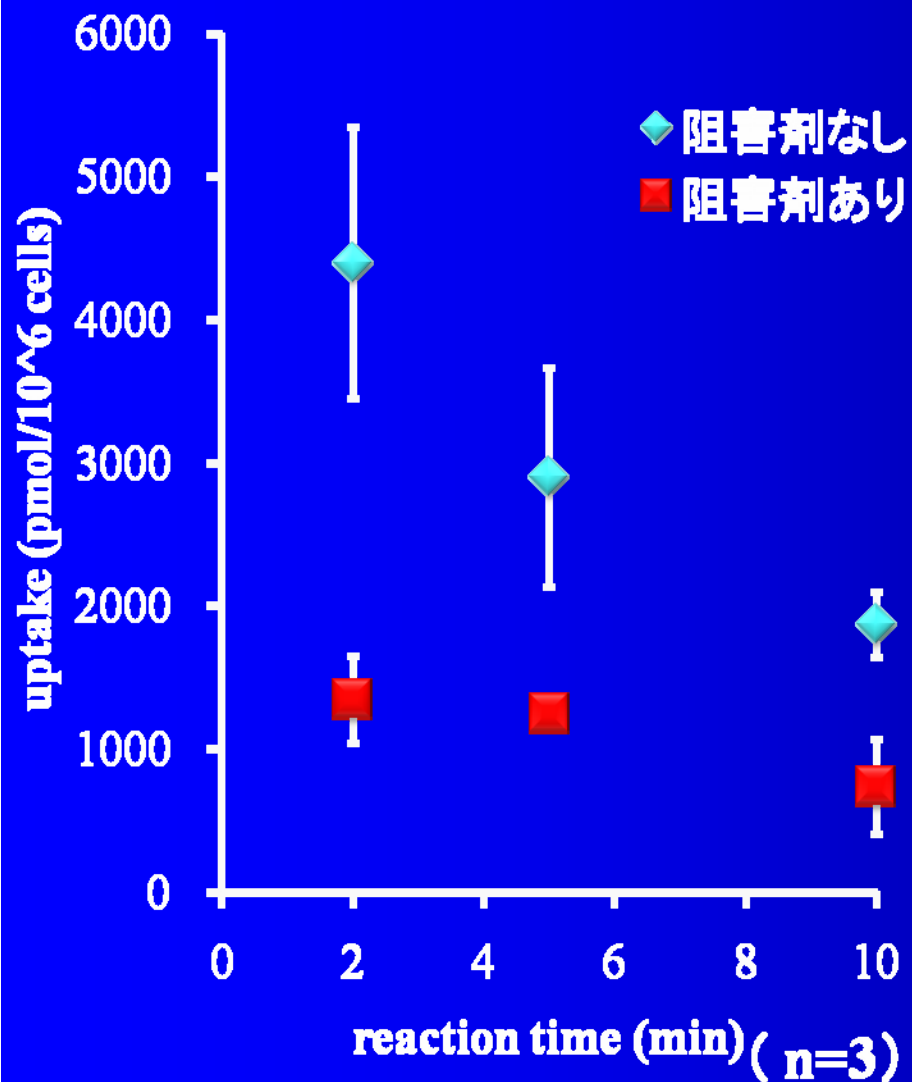
反応時間

1, 3, 5 min

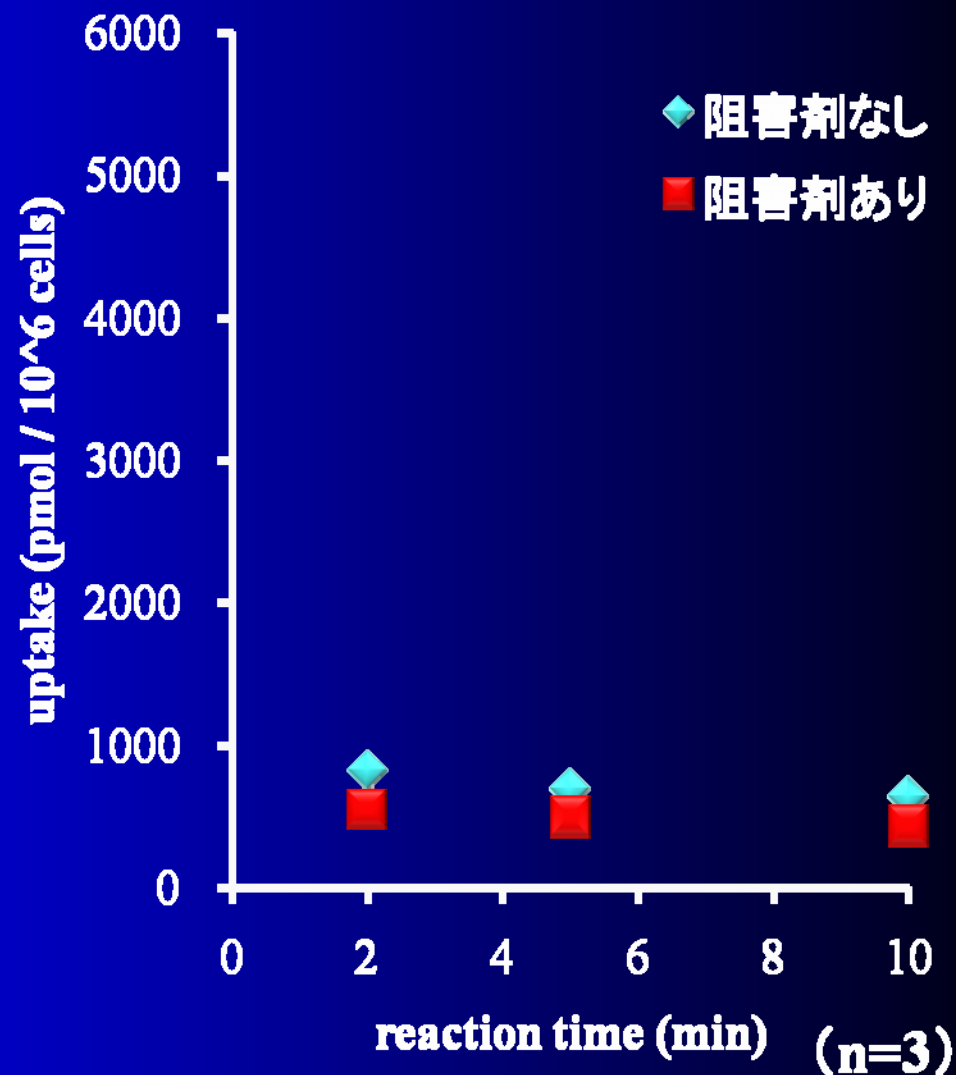


2) 取込トランスポーター試験 結果(培養7日目)

3D – Cell-able



2D – collagene plate



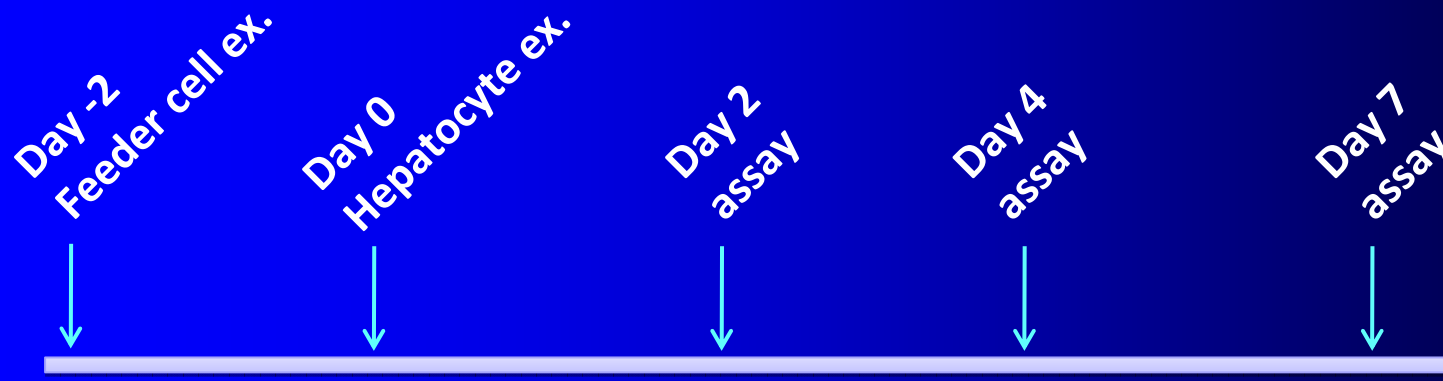
3) 胆管腔様構造の確認 スケジュール

肝細胞 移植時余剰肝組織由来ヒト肝実質細胞
(分離時細胞生存率 81%)

基質 5 (and 6)-Carboxy-2',7'-Dichlorofluorescein Diacetate (10 μ M)

反応条件 Hanks'Balanced Salt Solution (with Ca²⁺ & Mg²⁺)

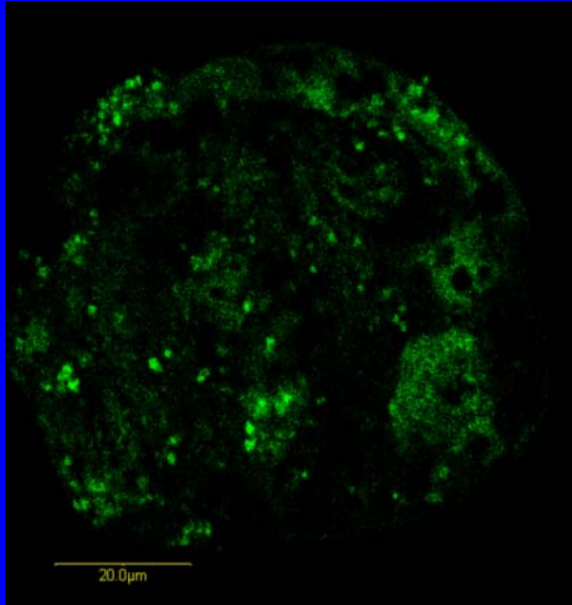
反応時間 10 min



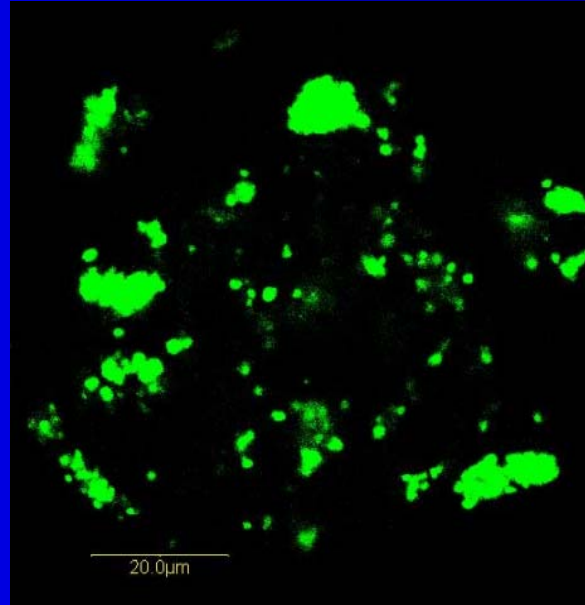
3) 胆管腔様構造の確認 - 経時変化

共焦点レーザー顕微鏡

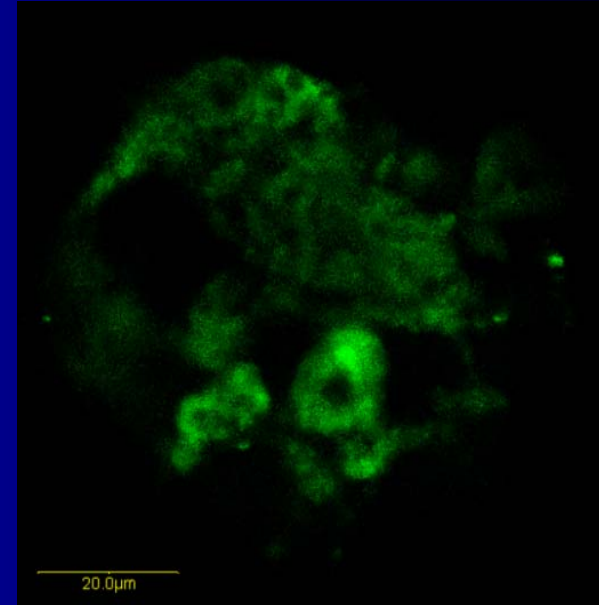
Day 4 - Ca²⁺存在下



Day 7 - Ca²⁺存在下



Day 7 - Ca²⁺非存在下



総括

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。テストステロン代謝能測定において培養7日目では2D, 3Dの大きな差はなかった。培養21日目におけるテストステロン6 β 水酸化活性は2D培養では低下しており、誘導もかかりづらかったが、3D培養では活性が上昇しており、誘導率も十分にあった。一方、テストステロングルクロナイド抱合活性では2D培養では培養ごとに低下しており、21日目では活性の確認ができなかったが、3D培養では活性が維持されていた。また、3D培養では51日目まで培養しており、活性の維持が確認できている。

2) 取り込みトランスポーター試験 (uptake)

初期活性は24.1 nmol/ 10^6 cellsであった。3次元培養では培養3日目で2.84 nmol/ 10^6 cells, 培養7日目で6.83 nmol/ 10^6 cellsを示したが、単層培養では培養3日目ですでに0.49 nmol/ 10^6 cellsとなり、きわめて低かった。

3) 胆管腔様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、肝細胞肝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。

謝辞

本研究は、肝組織をご提供頂きましたドナー・ご家族の皆様のご理解とご協力を頂き実施させていただきました。ここに深く謝意を表します。