

キメラマウス由来肝細胞の三次元培養

~PXB-able™の長期培養安定性とプレートフォーマットによる活性値の比較~

○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

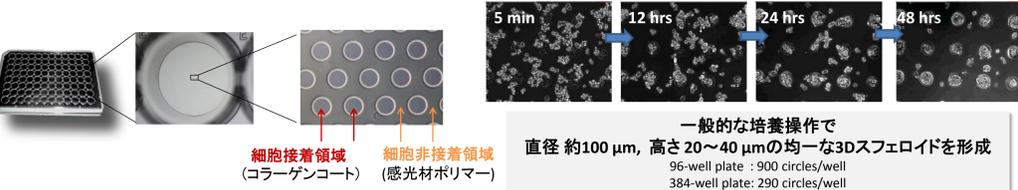
Introduction

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⁾。その中で我々は、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) を三次元培養プレート (Cell-able[®], 東洋合成工業株式会社) 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。今回、PXB-able™ の評価を実施した結果、スフェロイド断面のTEM写真から肝臓微小構造の再構築が認められた。さらにPXB-able™ では、アルブミン産生能・酵素活性などの肝特異的機能が、56日間と長期間維持されることを明らかにした。加えて、プレートタイプ (well数) の違いによる活性値への影響、および文献値を用いた他の肝細胞培養系との活性値比較についても併せて報告する。

Materials and Methods

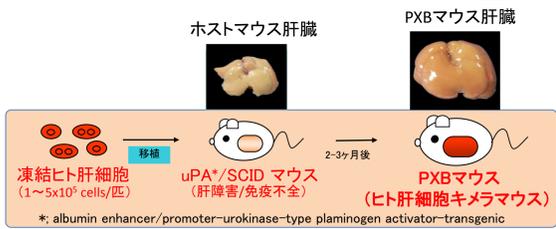
【Cell-able[®]とは】 TOYO GOSEI

Cell-able[®]とは、東洋合成工業(株)で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

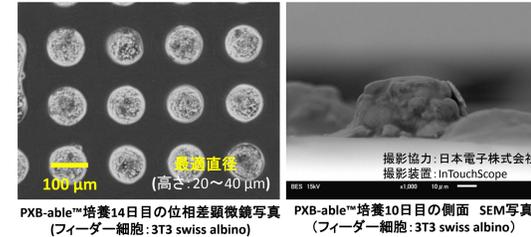
PXB-cells[®]とは、株式会社フェニックスバイオで安定生産しているPXBマウス[®] (ヒト肝細胞キメラマウス) から分離した新鮮ヒト肝細胞である。現在、PXB-cells[®] は薬物代謝試験やHBVの持続感染試験などの様々な分野で利用されている。



【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PXB-cells[®] (キメラマウス由来ヒト新鮮肝細胞) を三次元培養パターンプレート (Cell-able[®]) 上に96-well plateの場合30,000 cells/wellで播種し、dHCGM培地 (フェニックスバイオ) あるいはRM-101培地 (東洋合成工業) を用いて培養した。また、48-well、24-well、12-well plateには培養面積当たりの細胞数が等しくなるように細胞分散液を播種し、同様に培養した。

培養条件概要	
培養器材	Cell-able [®] plate (96-well, 48-well, 24-well, 12-well plate)
フィーダー細胞	3T3 swiss albino (マウス繊維芽細胞)
肝細胞	ヒト肝キメラマウス (PXBマウス [®]) 由来 ヒト新鮮肝細胞 (PXB-cells [®])
培地	dHCGM, RM-101



【TEM写真撮影】

- ① グルタルアルデヒド固定後PBS(-)で洗浄後1%四酸化オスミウムで後固定
- ② エタノール上昇系列により脱水し、プロピレンオキシド置換・樹脂浸透、エポキシ樹脂硬化後、超薄切
- ③ 電子染色 酢酸ウランとクエン酸鉛の2重染色
- ④ 透過電子顕微鏡 JEM-1400Plus (JEOL Ltd.) で観察

【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

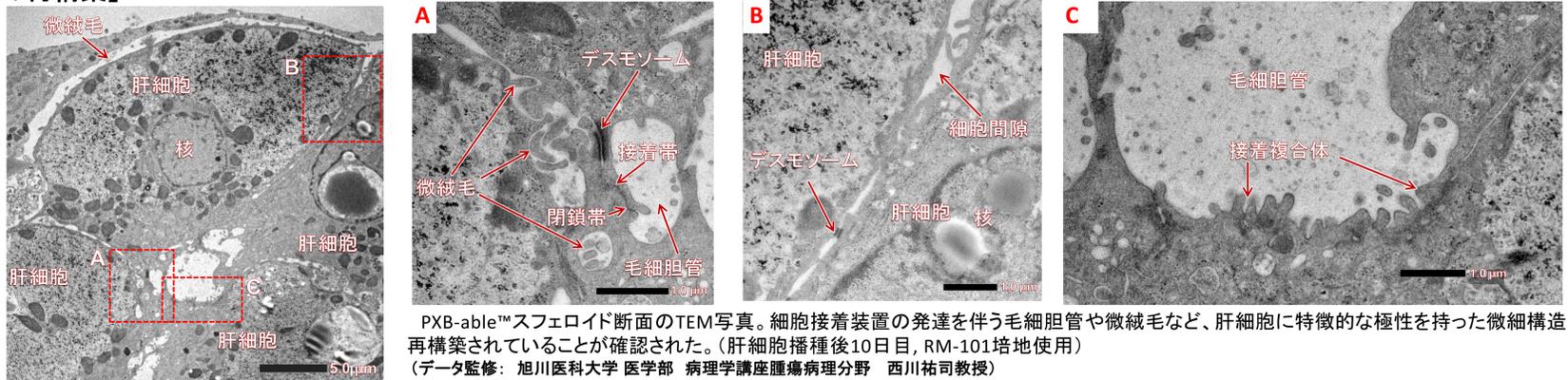
【CYP3A4活性、UGT活性測定】

- ① 100 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
- ② 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、Testosterone glucuronideの濃度を定量することによりUGT活性を測定

Results

【PXB-able™での肝微小構造の再構築】

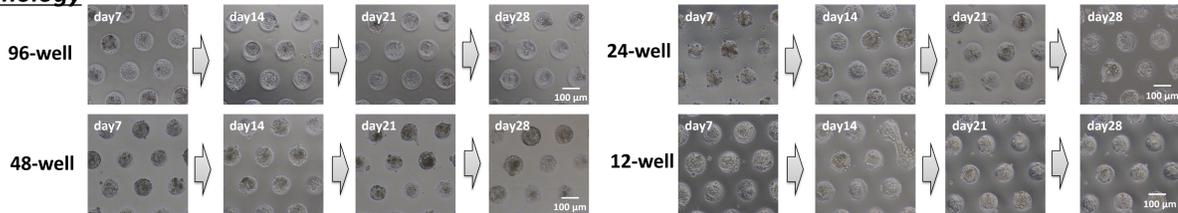
PXB-able™ スフェロイド断面のTEM写真



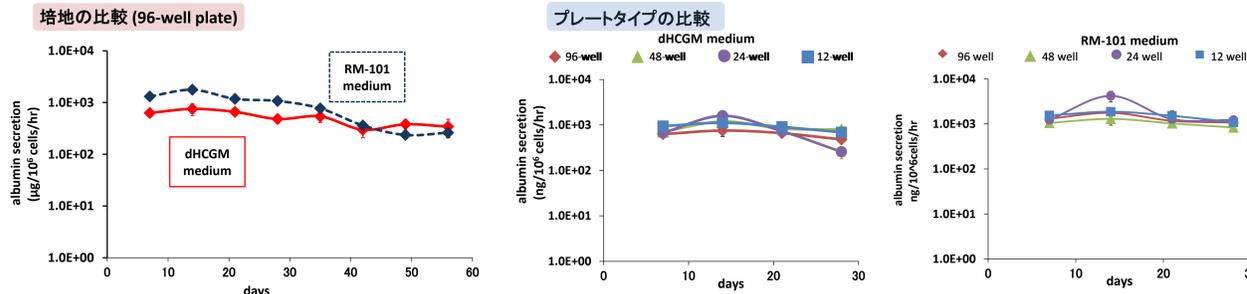
PXB-able™スフェロイド断面のTEM写真。細胞接着装置の発達を伴う毛細胆管や微絨毛など、肝細胞に特徴的な極性を持った微細構造が再構築されていることが確認された。(肝細胞播種後10日目, RM-101培地使用) (データ監修: 旭川医科大学 医学部 病理学講座腫瘍病理分野 西川祐司教授)

【長期培養における活性の経時変化】

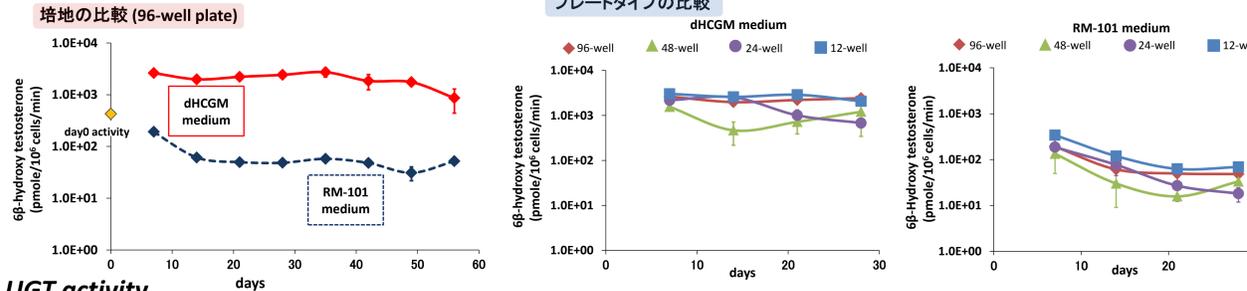
Morphology



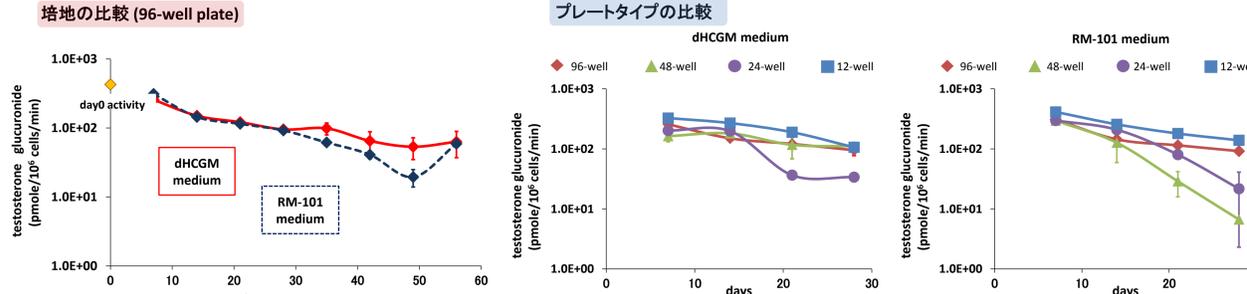
Albumin secretion



CYP3A4 activity



UGT activity



【他の培養系との活性値の比較】

Culture format	Hepatocyte cell type	Summary of method	CYP3A4 activity (6β-hydroxy testosterone, pmole/10 ⁶ cells/min)			Albumin secretion (μg/10 ⁶ cells/hr)	
			短期 (~7日目)	中期 (8~14日目)	長期 (15~28日目)	7日目	14日目
PXB-able™	PXB-cells [®]	3×10 ⁴ cells/well/96-well plate, dHCGM medium, Co-culture	2,627	1,980	2,417	0.6	0.7
		3×10 ⁴ cells/well/96-well plate, RM-101 medium, Co-culture	192	50	48	1.3	1.7
HepatoPac [®] 2)	Cryopreserved primary human hepatocyte	5,000 cells/well/96-well plate, Co-culture	190	2,000	2,000	7	9
2D sandwich 3)	Cryopreserved primary human hepatocyte	4×10 ⁵ cells/well/24-well plate, Williams maintenance media, Hu1717	100	25	NA	NA	NA
		Hu8200A	28	40	NA	NA	NA
		Hu8209	7	0	NA	NA	NA
		4×10 ⁵ cells/well/24-well plate, Williams maintenance media supplemented with HepExtend™, Hu1717	170	240	NA	NA	NA
2D sandwich 4)	Upcyte [®]	Donor151-03	353	174	NA	NA	NA
		donor653-03	31	71	NA	NA	NA
2D sandwich 5)	HepaRG™	1×10 ⁵ cells/well/96-well plate, Medium670	68	NA	NA	NA	NA

Conclusions

1. 微小構造の再構築
PXB-able™ 培養10日目のTEM写真解析において、スフェロイド内部に肝特異的な微小構造が再構築されていることを確認した。
2. PXB-able™長期培養における経時変化
① 形態
いずれのプレートタイプでも、スフェロイド形態は28日間維持された。
② アルブミン産生能、CYP3A4活性、UGT活性
いずれのプレートタイプでもアルブミン産生能、CYP3A4活性、UGT活性は28日間維持された。更に96-well plateでは56日目までそれらの活性が維持されることを確認した。
3. 他の肝細胞培養系で過去に発表された公知の活性値等と比較して、PXB-able™は長期間同等以上の活性維持を示した。

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) M. Shoffner, ASMS, 2015, presentation.
- 3) J. A. Bonzo et al., 19th North American ISSX Meeting, 2014, Poster P272.
- 4) M. Schaefer et al., Drug. Metab. Dispos., 2016, 44(3), 435-444.
- 5) J. P. Jackson et al., 17th North American ISSX Meeting, 2011, Poster P182.