

肝細胞機能制御を目的とした新規培養システムの開発

八木清仁,* 川瀬雅也,^a 磯田勝広,^b 近藤昌夫

Development of Novel Culture System for Regulation of Hepatocyte Function

Kiyohito YAGI,* Masaya KAWASE,^a Katsuhiro ISODA,^b and Masuo KONDOHGraduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University,
1-6 Yamada-oka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

(Received October 1, 2009)

Cultured hepatocytes are expected to be used for drug screening and bioartificial liver. Since hepatocytes lose their functions very rapidly *in vitro*, many attempts have been made to maintain their viability and functions. First, we want to introduce the surface modification of culture substrate using a starburst dendrimer. Addition of fructose to the terminal of the dendrimer was shown to be effective in maintaining hepatocyte function. As the second topic, we will show results of the use of a three-dimensional carrier for hepatocyte cultivation. Hepatocytes and bone marrow stromal cells were cocultured in silane beads, and packed into a radial flow-type bioreactor. The perfusion culture showed the effectiveness of bone marrow stromal cells for the maintenance of hepatocyte function. The next topic will be the trial of adenoviral gene transfer into hepatocytes. Thioredoxin gene was chosen because the products play important roles in redox control and antiapoptosis. The introduction of the gene could inhibit apoptosis and maintain the hepatocyte viability. Finally, we want to introduce the results on differentiation of stem cells into hepatocytes, because it is very difficult to obtain sufficient number of human hepatocytes. Human mesenchymal stem cells were cultured in the presence of several protein factors and the hepatocyte-specific marker was expressed after 2 weeks of induction culture. The use of human stem cells could be an important strategy for the support of a drug development system.

Key words—dendrimer; hepatocyte; radial flow-type bioreactor; mesenchymal stem cell

1. はじめに

培養肝細胞は医薬品開発のスクリーニング系やバイオ人工肝臓への応用が期待されているがその機能は *viability* の低下に伴い急速に消失していくため、機能維持を目的とした研究が活発に行われている。本総説ではこれまで我々が検討してきた培養基材の表面修飾、3次元培養、遺伝子導入、肝細胞の分化誘導について紹介する。足場依存性の細胞は培養基材の性質によって *viability* が著しく変動することが知られており、機能維持の成否は優れた培養基材の開発に依存していると言っても過言ではない。そこで機能性材料として注目されている樹木状

高分子デンドリマーを用いた基材表面修飾の検討において、デンドリマーの末端にフルクトースを付加すると培養肝細胞の生存性、機能が良好に維持されたことを示す。また培養用ディッシュを用いた2次元培養では応用範囲が限られるため培養工学的検討として多孔性担体を用いた3次元培養の試みを紹介する。さらに細胞を接着させた3次元担体をラジアルフロー型バイオリアクターに充填し灌流培養を行った検討において、肝細胞と骨髄間質細胞との共培養が機能維持に効果的であったことを示す。次に遺伝子工学的アプローチとしてアデノウィルスベクターを用いてチオレドキシンの遺伝子を導入することにより、肝細胞のアポトーシスを制御することが可能であったことを紹介する。最後に、細胞源に関する検討として再生医工学的アプローチによりヒト由来間葉系幹細胞を肝細胞へ誘導する試みを紹介し創薬支援システムへの応用について考察したい。

2. 機能性培養基材による肝機能制御

1985年に Tomalia らによって報告されたデンド

大阪大学大学院薬学研究科 (〒565-0871 吹田市山田丘1-6)

現所属: ^a長浜バイオ大学バイオサイエンス学科 (〒526-0829 長浜市田村町1266), ^b帝京平成大学薬学部 (〒290-0193 市原市潤井戸2289)

*e-mail: yagi@phs.osaka-u.ac.jp

本総説は、日本薬学会第129年会シンポジウムS24で発表したものを中心に記述したものである。

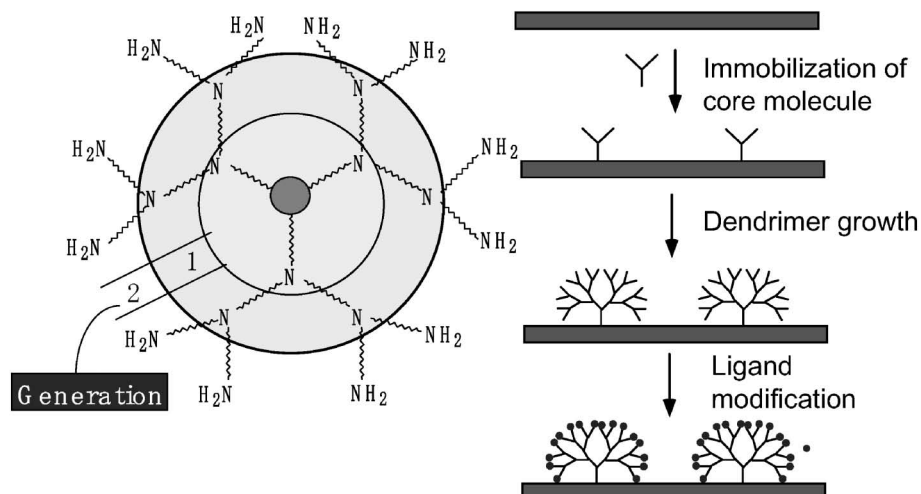


Fig. 1. Structure of Polyamidoamine Dendrimer and Application for Cell Culture

リマーは樹木状多分岐高分子であり、¹⁾様々な領域でその応用が検討されている。直径は約数十 nm の分子であり、Fig. 1 で示すように、中心部分のコア、骨格分子、末端アミノ基から構成され、正確な分子設計が可能である。デンドリマーは規則的な枝分かれ構造を有する分子で、中心のコア分子から、段階的に伸長反応を行うことで枝分かれ数を増加させることができる。また、伸長反応を繰り返すことにより最外部の密度が高くなり、内部の密度が低くなっている。Figure 1 に示すようなポリアミドアミンデンドリマーは末端アミノ基部分の外表面が正に帯電しており、反応性が高い特徴を有している。このような特徴を活かして、様々な分野でデンドリマーの研究が行われている。²⁻⁵⁾ 医療分野へのデンドリマーの応用としては、内部の密度が粗であることを利用して、デンドリマー内部に薬物や遺伝子の封入、また外部の反応性の高さを利用して外部固定を行っている。デンドリマーにアンチセンス遺伝子を導入、またデンドリマー外部に薬物を固定化することによる薬物の徐放化の検討も行われている。

このようなデンドリマーの特徴を活かし、筆者らはデンドリマーにリガンド分子を結合させ、肝細胞培養基材とする方法を考案した。Figure 2 に示すようにカリウム *tert*-ブトキシドを用い基材表面にヒドロキシル基を導入し、グルタルアルデヒドを介してデンドリマーの固定化を行った。世代増加反応はこの反応を繰り返すことにより行い、最後に末端アミノ基へリガンド分子を結合させた。

筆者らはこれまでにキトサンゲル上で肝実質細胞

を培養することに成功しており、特にキトサンの分子内アミノ基をフルクトースにより修飾したフルクトースキトサン上では未修飾のキトサンゲルよりも多くの細胞が接着し、肝特異的機能を維持することを報告した。そこでフルクトースに注目し、フルクトースをリガンドとしたフルクトースデンドリマーについて検討した。細胞非接着性のポリスチレンプレートにデンドリマーを固定化し、リガンドとしてフルクトースを修飾した。その結果、デンドリマーの世代数増加に伴い、修飾されたフルクトースも増加することを確認した。フルクトースデンドリマー上で数日培養を行うと成長因子などの添加なしに、細胞が高機能化と言われるスフェロイド（球状組織体）を形成した。⁶⁾ しかし、ここではスフェロイドの接着性が弱く、さらに接着性を上げる必要が生じた。そこで、リガンドとしてフルクトースと、肝細胞表面に存在するアシアロ糖タンパクレセプターのリガンドとなるガラクトースの混合溶液をリガンド溶液とし、共固定した F/G デンドリマーを用いたところ、スフェロイドの接着が維持された。この、F/G デンドリマー上で培養したラット初代



八木清仁

大阪大学大学院薬学研究科教授。1981年大阪大学大学院博士後期課程修了（薬学博士）。1982-1984年米国メリーランド大薬学部、NIH (NIEHS) で博士研究員として勤務。1983年大阪大学薬学部助手。1992年同助教授、2000年3月より現職。現在C型肝炎など肝疾患を対象とした創薬研究に取り組んでいる。

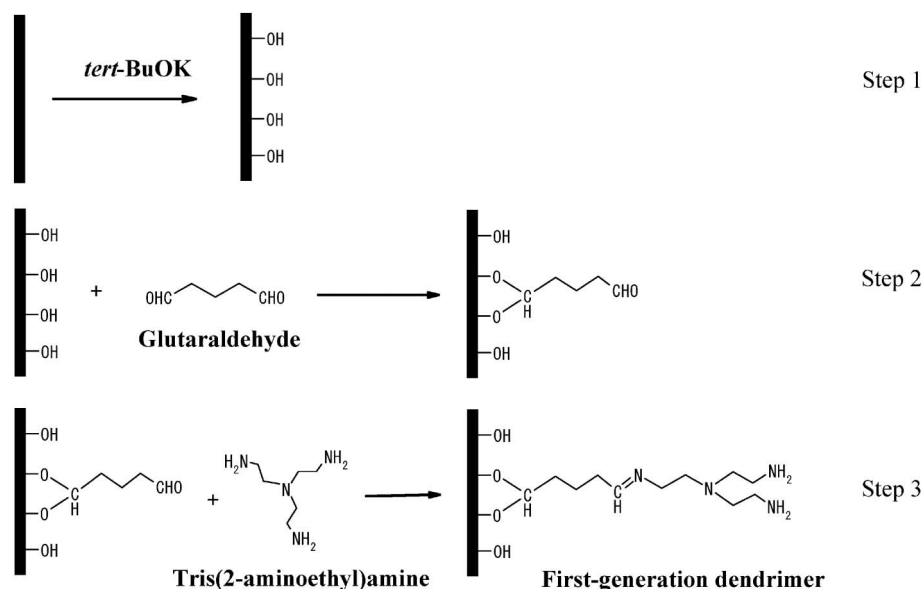


Fig. 2. Schematic Illustration of Dendrimer Immobilization onto the Surface of Polystyrene Plate

肝細胞は、リガンドがフルクトース、ガラクトース単独のものに比べ、肝特異的機能であるウレア合成能が向上し、アルブミン遺伝子の発現も維持しており、機能維持についても優れていることが確認できた。また、共焦点レーザー顕微鏡による解析から、リガンドのないデンドリマー上のスフェロイド内部の細胞はアポトーシスを起こしているのに対し、F/Gデンドリマー上のスフェロイドではアポトーシスが抑制されていることを確認した。⁷⁾

リガンド修飾デンドリマーを基材表面上に固定し、細胞培養に用いるアイデアは筆者ら独自のものである。これまでの検討から、細胞毎に異なるリガンドを用いることで、リガンド修飾デンドリマーによって最適な細胞培養表面の創出が可能であることを示してきた。大阪大学基礎工学研究科の田谷正仁教授のグループは筆者らとの共同研究においてデンドリマーの密度を変化させることにより軟骨細胞の形態、分化機能を制御することに成功した。^{8,9)} またD-グルコースと Epidermal growth factor をリガンドとして用いると細胞の増殖及び運動性を亢進できることを報告している。¹⁰⁾ さらに大阪大学医学系研究科の宮崎純一教授のグループはD-グルコースをデンドリマーにより培養表面に提示するとES細胞の未分化能が有意に維持されることを見い出している。¹¹⁾ このようにリガンド修飾デンドリマーは、細胞毎に最適化したカスタムメイドの培養基材表面創出のツールとなり、組織工学全般の発展に大きく貢

献することが期待される。

3. 3次元培養による肝機能制御

ラジアルフロー型バイオリアクター (RFB) は一般に円筒形のリアクター内に細胞接着用の担体を充填し円筒周囲より培養液あるいは血漿が中心部に向けて流れる構造をしている。RFBは従来のリアクターに比べ、灌流液の流速による剪断力が弱いいため細胞障害が少なく、酸素や栄養物の供給がより均一に行われることが知られている。これまで動物細胞が 1×10^8 cells/ml 以上の高密度で培養可能であることが示されている。¹²⁾ 筆者らはRFBをバイオ人工肝臓に応用することを目的とし多孔質ガラスビーズ (シランビーズ) を担体として肝細胞の灌流培養を行った。Figure 3にRFBを用いた培養システム図を示した。筆者らは骨髄間質細胞を肝細胞の生存性を延長し機能を強化するための支援細胞として選択した。骨髄間質細胞は骨髄においてコラーゲン、フィブロネクチンを始めとする細胞外マトリクスや種々の増殖因子を産生し、造血幹細胞や血球系の細胞の維持に重要な役割を演じていることが知られている。プラスチックディッシュによる2次元培養の実験より骨髄由来の間質細胞が肝細胞の機能を維持する効果があることを既に明らかにしており、¹³⁾ その効果が3次元担体を用いたRFBにおいて発現するか否かを検討した。

実験はSD系雄性ラット由来の細胞を用いて行った。肝細胞は生体内においては肝再生時旺盛に増殖

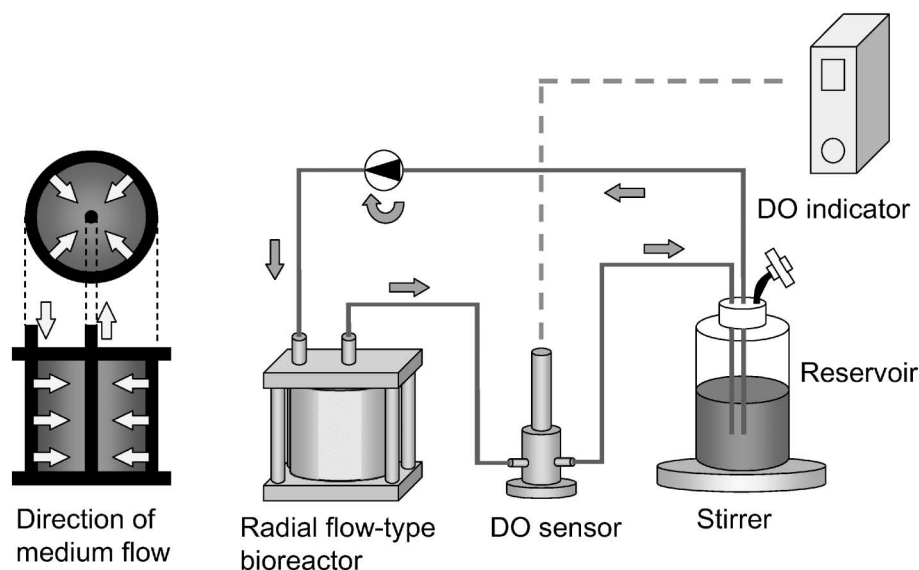
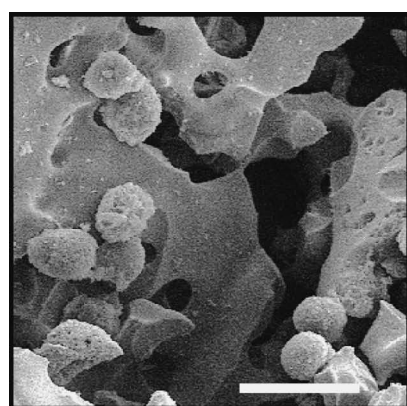
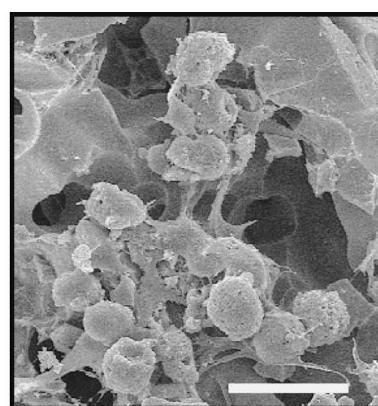


Fig. 3. Perfusion Culture of Hepatocytes by Radial Flow-type Bioreactor



Hepatocyte monoculture



Co-culture of hepatocytes and bone marrow stromal cells

Fig. 4. Electron Micrographs of Hepatocytes Cultured in Silan Beads
White bar indicates 50 μm .

するが *in vitro* では増殖させることは困難であるため初期接着した細胞数を維持することが重要となる。一方骨髄間質細胞は *in vitro* で活発に増殖するため、共培養時には最初に骨髄間質細胞を播種し担体上でサブコンフルエントに達するまで培養した後肝細胞を播種した。Figure 4 にシランビーズを用いた肝細胞単独培養、骨髄間質細胞との共培養を行った際の電子顕微鏡写真を示した。単独培養では直径約 15–20 ミクロンの球状をした肝細胞がシランビーズ上に接着している様子が観察される。一方共培養においてはシランビーズ上に伸展した骨髄間質細胞に肝細胞が接着していた。そしてそれぞれのシランビーズを充填した RFB を用いて 4 日間の連続

灌流培養を行った。その間 24 時間おきにサンプリングを行い、肝特異機能である尿素合成能を評価した。その結果、対照として行った肝細胞単独の 2 次元培養では 4 日間で機能は約 9% に低下したが、RFB の 3 次元培養においては 29% までの低下にとどまった。したがって RFB による灌流培養の効果が示された。さらに骨髄間質細胞との共培養により 47% の機能が有意に維持され、肝細胞に対する効果が 2 次元培養のみならず RFB を用いた 3 次元培養においても発現することが明らかとなった。骨髄間質細胞は培養によって増幅することが可能でありヒト由来、あるいは患者自身の細胞を将来使用することも視野におくとバイオ人工肝臓の機能を強化し得

る細胞源として有望と考えている。さらには骨髄細胞中には肝細胞へ分化可能な間葉系幹細胞 (MSC) が存在することから患者由来の細胞を利用した薬物代謝評価系の構築も可能であり個の医療への応用も期待される。

4. 遺伝子導入による肝機能制御

これまで肝がん細胞にアンモニア代謝, 薬物代謝に係わる個々の遺伝子を導入する試みは国内の他グループにより報告されている。^{14,15)} われわれは人工肝臓が担うべき数百という肝機能を考慮し細胞全体をグローバルに活性化し, かつ細胞死に対する抵抗性を付与することを目的として遺伝子導入を試みている。

チオレドキシンと呼ばれるタンパク質はリボヌクレオチドリダクターゼの生理的還元剤として発見されたが酸化的ストレスやアポトーシスに対して抵抗性を付与するという機能が報告され注目を浴びている。^{16,17)} われわれはこのチオレドキシン遺伝子を肝細胞へ導入することにより生体外において引き起こされるストレス及びアポトーシスに対し抵抗性を獲得させることを試みた。肝細胞は生体外では増殖が困難であること, そして遺伝子導入効率を考慮しアデノウィルスをベクターとして用いることとした。ヒトチオレドキシン遺伝子を挿入した組換えアデノウィルスを作成しラット肝細胞へ感染させた。ヒトチオレドキシンが発現していることをウェスタンブロットで確認後, 過酸化水素処理に対する抵抗性を調べた。1 mM 過酸化水素で 24 時間処理した後, アポトーシスを起こした細胞数を fluorescence activated cell sorting (FACS) により測定した。コントロールの肝細胞は約 80% がアポトーシスを起こしたのに対し, チオレドキシン遺伝子を導入した肝細胞は約 25% とアポトーシスに対して抵抗性を獲得したことが示された。また, 通常のポリスチレンプレートで培養したときの寿命が延長されるか否かを調べたところ明らかな効果が観察された。尿素合成能も同時に維持されチオレドキシン遺伝子導入の有効性が示された。¹⁸⁾ リアクターへ充填する細胞へ当該遺伝子をウィルスベクターを用いて導入することも可能であり, またチオレドキシントランスジェニック動物を作出しその肝細胞をパイオ人工肝臓や医薬品開発のスクリーニング系に適用することも将来可能となるであろう。

5. 肝細胞源の検討

肝細胞源としてはヒトの細胞を用いることが理想的である。再生医療用の細胞源としてこれまで ES 細胞, 骨髄細胞などが主に検討されてきたがわれわれは通常廃棄される組織から肝細胞へ分化可能な幹細胞を単離することができれば有用であると考えた。歯科領域では歯髄から MSC が単離されたことが報告されており,^{19,20)} 抜歯され廃棄される歯に着目した。虫歯の場合, 病原菌が含まれ再生医療に適用することは困難であるため, 歯科矯正時に抜歯される第 3 大臼歯, 通称 “親知らず” を用いることとした。矯正時に抜歯されるものは埋伏した状態であり, 未分化な歯胚組織が維持されている可能性が高く, 分化が進むと象牙質, 歯髄となる歯乳頭組織には有用な MSC が存在することが予想された。そこでインフォームドコンセントを得た後, 破棄された親知らずより歯乳頭組織を採取し MSC のクローン単離を試みた。

歯乳頭組織をはさみで細かく切断し, コラゲナーゼにより細胞を分散後組織培養用ディッシュに播種し α -MEM を用いて培養を行った。接着性の細胞を回収し FACS を用いて 96 穴プレートの 1 ウェルあたり 1 つの細胞が入るように播種した。単一細胞からコロニー形成したものを継代しさらに増殖させ, 2×10^4 cells を分化能の評価に使用し, 残りの細胞を凍結保存した。カルセインを利用した骨分化能を指標として幹細胞としての特性を有するクローンの選択を行った結果, コロニー形成能を有するものの約 30% が骨分化能を発現した。その中から特に高い骨分化能を示したクローンを用いて以下の検討を行った。

肝細胞への分化誘導には Hamazaki らの方法²¹⁾ に準じ, HGF, デキサメタゾン, ITS に加えて線維芽細胞増殖因子 (FGF), オンコスタチン M (OSM) を用いた。培養初期には細長い線維芽細胞用の形態であるが分化誘導を継続するにつれ, 2 週間後にはサイズの大きい多角の形態へと変化した。RT-PCR による解析の結果, 分化誘導 10 日でアルブミン遺伝子の発現が観察され, 逆に初期分化マーカーである AFP 遺伝子発現は減少する傾向にあった。次に肝障害ラットを用いて移植の効果を検討した。

ヒト細胞を移植するため拒絶反応を起こさない免疫不全のヌードラットを使用した。9 週齢のフィッ

シャー 344 系ヌードラットの門脈から四塩化炭素 (1 ml/kg body weight) を週 2 回, 4 週間投与し肝傷害を与えた. 分化誘導培地あるいは非誘導培地で培養後蛍光色素である PKH26 で染色し, 四塩化炭素初回投与 2 日後に門脈より 1×10^7 個の細胞を移植した. コントロールとしては四塩化炭素の代わりにオリーブオイルを腹腔内投与したもの, 及び四塩化炭素を投与し細胞の代わりに生理食塩水を門脈から投与したもの (sham operation) を用意した. 凍結肝臓切片を作成し蛍光観察を行った. 細胞移植群においては誘導培地, 非誘導培地で培養した双方で生着が確認された. 骨髄由来の間葉系幹細胞 (BMSC) を移植した際には個々の蛍光が散在していたが,²²⁾ 歯胚由来細胞移植の場合はコロニー状の像が観察されたことから生着後に増殖したものと思われる. *In vitro* の培養において歯胚由来細胞は BMSC に比べ旺盛な増殖能を有しており, 生着後の増殖を可能にしたものと思われる.

分化誘導した細胞の移植群では有意に血清 AST, ALT 値の低下, 肝線維化の抑制が観察された. 非誘導培地で培養した細胞を移植した群は肝臓内に生着していたにもかかわらず有意な治癒効果は現われなかった. これらの結果より肝細胞への方向付けを行うことが重要であることが示された.²³⁾ このように破棄される組織から再生医療に有用な幹細胞が得られることは重要であり, 自己の親知らずを抜歯した際, 歯胚由来幹細胞を細胞バンクに保存しておけば自身の細胞を肝疾患の治療に利用することが可能となるであろう. また旺盛な増殖能があることから移植までのつなぎとしてバイオ人工肝臓へ利用することができること, 医薬品スクリーニングの評価系としても, 倫理的な問題を持つ ES 細胞, 強制的に未分化状態に回帰させた iPS 細胞由来のものに比べ有用であると考えている.

6. おわりに

創薬の過程で毒性, 有効性, 及び薬物代謝の評価に大量の動物が用いられてきたが, 今後動物愛護の観点から *in vitro* の評価に置き換えていくことが求められている. 肝細胞は毒性や薬物代謝を評価する際に重要な役割を果たすことは明らかであるがこれまで初代培養細胞の不安定性から有用な評価系は構築されていない. 一般的に肝細胞のような足場依存性の細胞は培養表面の性状によりその生存性, 機能

が著しく変動することが知られている. 本総説では dendroliamer を用いる機能性培養基材の創製, 3 次元培養による機能維持効果, また遺伝子導入による寿命延長について筆者らの成果を紹介した. 最小限の細胞で評価系を構築することに役立つ技術開発につながれば願っている. さらに通常廃棄されるヒトの組織から肝細胞を分化誘導し細胞源として用いることができれば倫理的問題, 種による差異を含め種々の問題点を解決できることになる.

REFERENCES

- 1) Tomalia D. A., Baker H., Dewald J., Hall M., Kallos G., Martin S., Roeck J., Ryder J., Smith P., *Polym. J.*, **17**, 117-132 (1985).
- 2) Bielinska A., Kukowska-Latallo J. F., Johnson J., Tomalia D. A., Baker J. R. Jr., *Nucleic Acids Res.*, **24**, 2176-2182 (1996).
- 3) Braun C. S., Vetro J. A., Tomalia D. A., Koe G. S., Koe J. G., Middaugh C. R., *J. Pharm. Sci.*, **94**, 423-436 (2005).
- 4) Svenson S., Tomalia D. A., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **57**, 2106-2129 (2005).
- 5) Tomalia D. A., Reyna L. A., Svenson S., *Biochem. Soc. Trans.*, **35**, 61-67 (2007).
- 6) Kawase M., Shiomi T., Matsui H., Ouji Y., Higashiyama S., Tsutsui T., Yagi K., *J. Biomed. Mater. Res.*, **54**, 519-524 (2001).
- 7) Higashiyama S., Noda M., Kawase M., Yagi K., *J. Biomed. Mater. Res.*, **64A**, 475-482 (2003).
- 8) Kim M.-H., Kino-oka M., Kawase M., Yagi K., Taya M., *J. Biosci. Bioeng.*, **103**, 192-199 (2007).
- 9) Kino-oka M., Morinaga Y., Kim M.-H., Takezawa Y., Kawase M., Yagi K., Taya M., *Biomaterials*, **28**, 1680-1688 (2007).
- 10) Kim M.-H., Kino-oka M., Kawase M., Yagi K., Taya M., *J. Biosci. Bioeng.*, **104**, 428-431 (2007).
- 11) Mashayekhan S., Kim M.-H., Miyazaki S., Tashiro F., Kino-oka M., Taya M., Miyazaki J.-I., *Biomaterials*, **29**, 4236-4243 (2008).
- 12) Hongo T., Kajikawa M., Ishida S., Ozawa S., Ohno Y., Sawada J.-I., Umezawa A., Ishikawa Y., Kobayashi T., Honda H., *J. Biosci. Bioeng.*, **99**, 237-244 (2005).
- 13) Isoda K., Takeda M., Higashiyama S., Ka-

- wase M., Yagi K., *J. Biosci. Bioeng.*, **97**, 343–346 (2004).
- 14) Enosawa S., Miyashita T., Suzuki S., Li X. K., Tsunoda M., Amemiya H., Yamanaka M., Hiramatsu S., Tanimura N., Omasa T., Suga K., Matsumura T., *Cell Transplant.*, **9**, 711–715 (2000).
- 15) Wang N., Tsuruoka S., Yamamoto H., Enosawa S., Omasa T., Sata N., Matsumura T., Nagai H., Fujimura A., *Artif. Organs*, **29**, 681–684 (2005).
- 16) Saitoh M., Nishitoh H., Fujii M., Takeda K., Tobiume K., Sawada Y., Kawabata M., Miyazono K., Ichijo H., *EMBO J.*, **17**, 2596–2606 (1998).
- 17) Kondo N., Nakamura H., Masutani H., Yodoi J., *Antioxid. Redox Signal.*, **8**, 1881–1890 (2006).
- 18) Tsutsui T., Koide H., Fukahori H., Isoda K., Higashiyama S., Maeda I., Tashiro F., Yamato E., Miyazaki J., Yodoi J., Kawase M., Yagi K., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **307**, 765–770 (2003).
- 19) Gronthos S., Mankani M., Brahimi J., Robey P. G., Shi S., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 13625–13630 (2000).
- 20) Pierdomenico L., Bonsi L., Calvitti M., Rondelli D., Arpinati M., Chirumbolo G., Becchetti E., Marchionni C., Alviano F., Fossati V., Staffolani N., Franchina M., Grossi A., Bagnara G. P., *Transplantation*, **80**, 836–842 (2005).
- 21) Hamazaki T., Iiboshi Y., Oka M., Papst P. J., Meacham A. M., Zon L. I., Terada N., *FEBS Lett.*, **497**, 15–19 (2001).
- 22) Oyagi S., Hirose M., Kojima M., Okuyama M., Kawase M., Nakamura T., Ohgushi H., Yagi K., *J. Hepatol.*, **44**, 742–748 (2006).
- 23) Ikeda E., Yagi K., Kojima M., Yagyuu T., Ohshima A., Sobajima S., Tadokoro M., Katsube Y., Isoda K., Kondoh M., Kawase M., Go M., Adachi H., Yokota Y., Kirita T., Ohgushi H., *Differentiation*, **76**, 495–505 (2008).