

インビトロ細胞アッセイの高度化に向けた肝組織工学

篠原満利恵^{1*}・酒井 康行^{1,2}

はじめに

ヒト培養肝組織を用いたインビトロ細胞アッセイは、開発された医薬品や化粧品成分の有効性や安全性を早い段階で評価するために必要である。実際、遊離肝細胞やマイクロソームを用いた短期間の培養による代謝、薬動試験が広く行われている¹⁾。また、ヒトの毒性予測を目指したスフェロイド培養など、比較的長期間培養して評価を行うための培養肝組織についても盛んに検討されている²⁾。しかしながら、インビトロで構築された肝組織の機能は、生体内の多種多様な肝機能のうち、ごく限定的なものであり、第2相の薬物代謝や薬物間相互作用は十分に評価されていない³⁾。

培養ヒト肝組織を形成する細胞ソースとしては、凍結初代肝細胞、不死化肝細胞、肝がん由来細胞株、ヒトiPS細胞由来の肝細胞などが考えられるが、これらの機能維持が非常に難しい。というのも、初代肝細胞は培養によって代謝能その他肝細胞特異的な機能が著しく低下し、不死化肝細胞や肝細胞株は初代肝細胞よりも機能が低い。そのため、培養肝細胞の機能を維持する方法として長期間の培養に用いられるスフェロイド培養であっても、十分な機能を維持した培養、さらにはヒトへの外挿性を有する評価ができていないと言え難い。

さらに、現状では、さまざまな細胞ソースを用いた細胞アッセイについて、細胞ソース自体の機能評価はもちろんのこと、各種評価における培養方法などは各細胞供給機関やユーザー独自の手法に依るところが多く、異なる細胞ソース、実験系での比較はきわめて困難である。

筆者らはこれまで、インビトロ細胞アッセイの標準法として用いることができる、生理学的な応答を示す培養肝組織の構築を目指して検討を行ってきた。本稿では、筆者らの検討を基に、より生理学的な応答を得るための肝組織構築手法について紹介する。

酸素透過性基板上での肝組織構築

インビトロ細胞アッセイにおいて、一般的な培養プレートによるアッセイ方法は、液交換性とその他既存の測定機器への適応などの点から有用である。また、培養組織の厚みは、薬物代謝の測定などを行う際の基質の取

り込みと代謝物の培地中への拡散に差し障りのないものが望ましい。すなわち、マルチウェルプレートでの単層培養は、ハイスループットマルチスクリーニングにはとても有用であると考えられる。しかしながら、肝細胞は、線維芽細胞などに比べて酸素消費量がきわめて高い。そのため、一般的なポリスチレン製の培養プレートを用いて飽和密度で培養した場合、緻密に張り巡らされた血管網からの酸素供給により好気呼吸を行っている生体内とは異なり、嫌気的環境におかれることで、培養がしばしば困難であることは1960年代より指摘されてきた⁴⁾。

筆者らは、培養底面がガス透過性基板（ポリジメチルシロキサン；PDMS）となっている培養プレートを用いることで、肝細胞を培養する際の酸素供給の問題を抜本的に解決した培養方法を検討してきた。培養底面がガス透過性となることで、細胞層に十分な酸素を供給できるとともに、培養環境の酸素濃度を変化させることで細胞に暴露される酸素濃度を制御することができる。すなわち、生体内の酸素濃度を考慮したより生理的な条件で培養することが可能となる^{5,6)}。以下、概略を紹介する。

培養底面がPDMSである培養プレート（PDMSプレート）上にラット肝細胞を飽和密度（ 1×10^5 cells/cm²）で播種し、酸素濃度5、10、20%雰囲気下で培養を行った。ポリスチレンプレート上で培養した場合には、マトリゲルを培養液に添加したサンドイッチ培養を行っても、培養7日目までに細胞の剥離が確認されたのに対して、PDMSプレートでは14日以上安定して培養が可能であった。また、培養14日目のCyp1A1/2の活性をポリスチレン製のプレート上での培養と比較すると、PDMSプレートにおいてポリスチレン上での培養より2倍以上活性が高いという結果となった。さらに興味深いことに、PDMSプレートでの培養の中でも10%酸素濃度雰囲気下で培養した場合がもっともCyp1A1/2の活性が高くなった（図1）。生体内の酸素濃度は5–13%に維持されていることから⁷⁾、より生理的環境に近い酸素濃度雰囲気下での培養が重要であることが示唆された⁵⁾。

PDMSは微細加工性に優れた材料であるため、培養表面をマイクロウェルの形状にすることで、スフェロイド形成も可能である。筆者らは、マルチウェルプレートでの培養表面を高密度にマイクロウェルが配置された構造

*著者紹介 ¹東京大学 生産技術研究所 E-mail: marie-s@iis.u-tokyo.ac.jp

²東京大学工学系研究科化学システム工学専攻 E-mail: sakaiyas@iis.u-tokyo.ac.jp

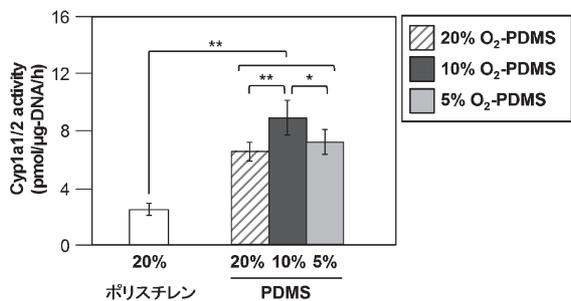


図1. ポリスチレンおよびPDMS上におけるラット肝細胞の培養14日目のCyp1A1/2活性

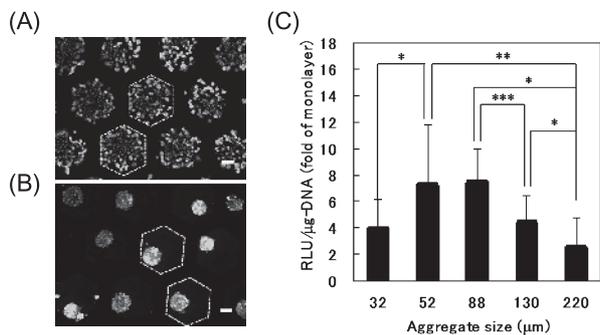


図2. PDMSマイクロウェル構造を用いたスフェロイド形成。(A) ポリスチレン上での培養 (培養1日目), (B) PDMS上での培養 (培養1日目), (C) CYP3A2の活性とスフェロイドの大きさの関係。(単層培養を1.0として規格化)

とするため、マイクロウェルのPDMSシートを作製し、ポリスチレンおよびPDMSプレートの各ウェルの中にマイクロウェルのPDMSシートを入れた。このプレートの各ウェルにラット初代肝細胞を $1-4 \times 10^5$ cells/cm²の密度で播種、培養した⁸⁾。

ポリスチレン底面では凝集傾向が弱いのに対し、PDMS上では速やかに凝集する様子が観察された(図2A, B)。また、培養密度を飽和密度 (1×10^5 cells/cm²)の4倍まで高めてもPDMSプレート上ではスフェロイドを形成するのに対し、TCPSプレートではすべて死滅した。さらに、マイクロウェルの大きさを変えることで異なる径のスフェロイドを形成でき、CYP3A2活性評価より、単層培養よりもスフェロイドの活性が高く、適切なスフェロイドの大きさが存在する可能性が示唆された(図2C)。これらの結果から、酸素供給を改善することで、肝組織形成の効率化と形成した代謝酵素の活性を向上させる培養組織の大きさが存在する可能性が明らかとなった。

なお、酸素透過性のPDMSプレートは、VECELL[®] G-plateとしてベセル株式会社により6ウェル、24ウェル、96ウェル、384ウェルプレートが製造されており、コス

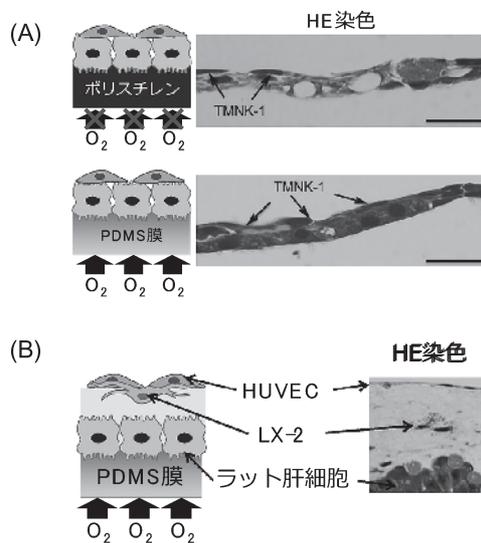


図3. 肝細胞と非実質肝細胞の階層的な共培養組織形成とHE染色図。(A) ポリスチレンおよびPDMS上での共培養, (B) 肝細胞, 星細胞, 類洞内皮細胞の階層構造を模倣した共培養。

モバイオ株式会社より購入可能である。

階層的重層化共培養

筆者らは、現在、前節で紹介したPDMSプレートを用いて、より高度に組織化された肝組織構築に取り組んでいる。肝臓は、その主要な機能を担う実質細胞と実質細胞の増殖や生存を支える星細胞、類洞内皮細胞、クッパー細胞といった非実質細胞から構成されており、マイクロにはそれらが階層的に重層化した構造をとっている。再構築した肝組織の機能を維持し、より生理的な応答を得るためには、実質細胞のみならず、非実質細胞との相互作用が重要であると考えられている²⁾。すなわち、生体内の肝組織の構造を模倣し、培養底面に肝実質細胞、その上に星細胞、培養液側を類洞内皮細胞といった順で階層構造を形成することが有用であると考えられる。

しかしながら、従来のポリスチレンプレートでの培養は、酸素供給が不足しているため、重層化培養を行うことは困難であった。実際、ラット肝細胞とヒト由来類洞内皮細胞株 (TMNK-1) を共培養した場合、ポリスチレンプレート上では肝細胞の死滅とまばらな階層構造が観察された。そこで、筆者らは前節で紹介したPDMSプレート上で同様に共培養を行い、ほぼ細胞死が見られず階層構造が維持されている様子を確認した⁹⁾ (図3A)。

さらに、PDMSプレート上では、肝実質細胞、星細胞、血管内皮細胞の三層の階層構造の培養も可能であった(図3B)。興味深いことに、共培養肝組織では、炎症刺激に対する耐性を獲得する傾向を確かめている¹⁰⁾。具体

的には、TNF- α を培養液に加えた場合、血管内皮細胞のみ、または星細胞のみの培養において血管内皮細胞の活性化および星細胞の活性化が見られるのに対し、共培養では活性化が沈静化して、TNF- α を加えていない場合とほぼ変わらない状態を維持した。これは、生体内での防御機構に類似するものと考えている。このように、肝細胞単独ではなく、共培養を行い、生体に近い構造の組織を形成することで、単一の細胞で構成される組織では得られなかった、より生理的応答を得られる組織構築が可能となることが期待される。

灌流培養

これまで紹介したPDMSプレートでの肝組織は、静置培養によるものである。静置培養において、臓器間相互作用の評価をする手法としては、肝組織を培養した際の培養液を用いて対象組織を培養する手法が考えられるが、この方法だとハイスループットな評価は難しく、経時的な測定を行うことも困難である。そこで、肝組織と対象臓器由来の組織を灌流培養することで、代謝物を対象臓器由来の組織に暴露する実験系を組むことが可能となる。また、生体内の肝細胞は常に血流にさらされているが、灌流培養により液流を利用して血流の影響を踏まえた評価系の確立が可能となる。たとえば、肝臓の内部では、門脈近傍から中心静脈近傍にかけて血液の流れに沿って酸素濃度勾配が形成され各種細胞機能が異なるゾーンを有しているが、灌流培養によるそれらの再現が試みられている。具体的には、細胞の酸素消費により、灌流培養部分の入口と出口の酸素濃度を変化させる方法や、培養基板に部分的に通気孔を配置することで、培養部の酸素濃度勾配を形成させる手法が報告されている。また、酸素濃度の違いにより、生体内において血中酸素濃度の高い門脈領域と低い中心静脈領域特異的な遺伝子発現がみられることが確認されている^{11,12)}。

筆者らは、マイクロ流体デバイス中でヒトiPS細胞から分化した肝細胞を培養し、類洞内皮細胞と実質細胞の

住み分けや成熟化がみられることを確認している¹³⁾。さらには、肝組織と脂肪組織、肺組織、小腸組織など他臓器由来の組織の灌流培養を行うことで、肝臓と他臓器の臓器間相互作用についての検討を進めている¹⁴⁾。

おわりに

肝臓は、その緻密な構造により多種多様な機能を維持しているが、培養組織としてその機能を維持すること、さらには、ヒトへの外挿性を有するインビトロ細胞アッセイ手法を確立することは非常に難しい。しかしながら、培養肝組織の質を向上させることで少しでもより生理的な応答を得られる培養系が確立できると考えている。本稿では、酸素供給の改善による高機能な肝組織化の検討や肝臓の構成細胞を階層的に重層化した肝組織を構築する手法について概説した。より十分な機能と生理的な応答を示す培養肝組織を構築することで、高度なインビトロ細胞アッセイが可能となることが期待される。

文 献

- 1) Zhang, D. *et al.*: *Acta Pharm. Sin. B*, **2**, 549 (2012).
- 2) Soldatow, V. V. Y. *et al.*: *Toxicol. Res. (Camb)*, **2**, 23 (2013).
- 3) Excretory, M. H. *et al.*: *Chemi. Res. Toxicol.*, **22**, 357 (2017).
- 4) Stevens, K. M. *et al.*: *Nature*, **206**, 199 (1965).
- 5) Xiao, W. *et al.*: *Biotechnol. Prog.*, **30**, 1401 (2014).
- 6) Shinohara, M. *et al.*: *Biotechnol. Prog.*, **30**, 1 (2013).
- 7) Colnot, S. and Perret, C.: *Molecular pathology of liver diseases, Liver zonation*, **5**, 7, Springer (2011).
- 8) Shinohara, M. *et al.*: *Biomed. Phys. Eng. Express*, **3**, 045016 (2017).
- 9) Xiao, W. *et al.*: *Integr. Biol.*, **7**, 1412 (2015).
- 10) Danoy, M. *et al.*: *Integr. Biol.*, **9**, 4 (2017).
- 11) Allen, J. W. *et al.*: *Toxicol. Sci.*, **84**, 110 (2005).
- 12) Sato, A. *et al.*: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **453**, 767 (2014).
- 13) Leclerc, E. *et al.*: *Genomics*, **109**, 16 (2016).
- 14) Sakai, Y. *et al.*: *J. Artif. Organs*, **6**, 273 (2003).