

20000481

厚生科学研究費補助金
高度先端医療研究事業

厚生科学研究費補助金総括研究報告書

生物材料の特性を利用したバイオ血液
浄化システムの開発

2000年度

平成13年3月

主任研究者 鈴木 盛一
(国立小児病院小児医療研究センター)

分担研究者 絵野沢 伸
雨宮 浩
菅 健一
藤村 昭夫
松村外志張

生物材料の特性を利用したバイオ血液浄化システムの開発

主任研究者 鈴木盛一 国立小児病院小児医療研究センター実験外科生体工学部 部長

研究要旨：現状の工学的血液浄化法を一步進め、毒性物質の選択的能動輸送を行うバイオ血液浄化法の基礎的素材の開発を行っている。肝・腎由来細胞の共培養による能動輸送系を構築するため伸張ポリテトラフルオロエチレン（ePTFE）膜を用い培養したところ、緊密な細胞層形成が見られ、PCTL-MDRを増殖させた反対面にGS-HepG2を付着増殖させることができ、この膜は小分子（イヌリン）の拡散は阻止しながらジゴキシンやドキシソルピシンといった薬物を能動輸送した。テストステロン添加では、GS-HepG2が産生した代謝物をPCTL-MDRが輸送した。株化細胞の増殖を放射線照射により抑えリアクターの使用期間を延長する方法を検討した。スケールアップ化のために200cm²（保持細胞約5x10⁸個）のePTFE膜を積層するモジュールを設計した。まず、その基本単位モジュールで細胞培養しディッシュレベルで確認された輸送機能等を実験中である。

1. 概要

我が国で脳死肝移植が可能となり3年余りが経過したが移植件数の伸びは未だにはかばかしくない。また、最新例で高齢マージナルドナー肝移植が不幸な転帰をとったことや近年増加した成人間の生体部分肝移植では十分量のドナー肝が得られないこと等、末期肝不全や肝移植救済の新規治療手段の開発は重要度を増している。このような背景は、ある程度海外にも共通し種々の研究グループが人工器材に細胞を組合わせた体外型バイオ人工肝の開発を行っている。細胞素材として分離ブタ肝細胞使用が主流であるが、我々は樹立細胞株を遺伝子工学的に高機能化し用いるという方針をとってきた。

バイオ人工肝はほぼ全ての場合細胞と血漿という2要素で構成されている。しかしながら実際の肝では細胞は脈管系と胆管系に接し、また解毒という観点から腎をも含めた代謝・排泄システムが必要である。一方、工学的人工肝と称される中空糸モジュールによる透析や血漿交換は、血漿成分を要不要に関わらず分子量に依存して排除する。我々は毒性物質を選択的に能動輸送するバイオ血液浄化システムの構築をめざし、肝由来細胞と腎由来細胞の共培養系を検討している。肝細胞としてヒト肝芽種由来HepG2細胞、腎細胞として家兎腎由来PCTL細胞を選択、HepG2はグルタミン合成酵素（GS）遺伝子導入によりアンモニア除去能を付加したGS-HepG2とし、PCTLは薬物輸送膜タンパク（Multi Drug Resistance Protein（MDR））を導入したPCTL-MDRとした。それぞれの細胞の共培養による毒性物質の選択的能動輸送システムを構築するとともに、個々の細胞について更なる高機能化を行っている。

2. 研究項目

- 1) 肝・腎由来細胞の共培養による能動輸送系の構築
- 2) 肝由来細胞の高機能化
- 3) 腎由来細胞の高機能化
- 4) その他（肝移植へのつなぎ治療としての評価実験系開発、ヒト組織の研究資源としての取扱いの検討）（要旨略）

3. 結果・考察・進行状況

1) 肝・腎由来細胞の共培養による能動輸送系の構築

培養基質として伸張ポリテトラフルオロエチレン膜（ePTFE）を用いた。同膜上で緊密な細胞層形成が見られ、PCTL-MDRを増殖させた反対面にGS-HepG2を付着増殖させることができた。さらにこの膜は小分子（イヌリン）の拡散

は阻止しながらジゴキシンやドキシソルピシンといった薬物を能動輸送した。テストステロン添加では、GS-HepG2が産生した代謝物をPCTL-MDRが輸送した。株化細胞の増殖を放射線照射により抑えリアクターの使用期間を延長する方法を検討した。スケールアップ化のために200cm²（保持細胞約5x10⁸個）のePTFE膜を積層するモジュールを設計した。まず、その基本単位モジュールで細胞培養しディッシュレベルで確認された輸送機能等を実験中である。

2) 肝由来細胞の高機能化

HepG2の薬物代謝活性を高めるため、CYP3A4遺伝子を含むGS遺伝子増幅ベクターを構築した。前実験として構築ベクターをCHO細胞に導入した。この細胞のCYP3A4活性（テストステロン6-β水酸化活性）は21pmol/分/mgタンパクであった。次いで同ベクターをHepG2に導入した。そのCYP3A4活性は野生株の0.65pmol/分/mgタンパクに対して430pmol/分/mgタンパクとなった。この値は組換えCHO細胞の約20倍の活性である。また、HepG2にCYP3A4誘導剤リファンピシンを作用させても、同活性は1.8~4倍の上昇に過ぎないことからCYP遺伝子導入は明らかに細胞機能を著しく上昇させたことがわかる。現在、構築した細胞株に対し遺伝子増幅を行っている。

3) 腎由来細胞の高機能化

抱合型ビリルビンは肝において産生され、MRP（multidrug resistance-related protein）の一種であるMRP-2によって胆汁中へ排泄される。MRP-2以上に抱合型ビリルビン輸送能の高い培養細胞を作成しハイブリッド型人工臓器へ応用すべく、MRP-2と共通の膜貫通部位をもつホモロジーcDNAをgene bankよりスクリーニングし、ヒト脳より未知遺伝子として登録されていたクローンを発見し全長を求めた。このcDNAは約6Kb、アミノ酸としてMRP-2と25%の相同性を持ち、機能をXenopus oocyte発現系で解析したところ、Estradiol-β-glucuronide輸送能は対照の100倍以上となり、またKm=30μM、Vmax=8.4pmol/hr/eggとMRP-2とほぼ同等であった。ATP依存性や阻害薬に対する反応性も他のMRP familyの中で、最もMRP-2に近かった。現在、これをヒト腎由来細胞に導入し機能解析中である。

遺伝子組換え細胞を用いた肝解毒機能を有する細胞株の開発に関する研究

分担研究者 菅 健一 大阪大学大学院工学研究科 応用生物工学専攻 教授

研究要旨：本研究では、バイオ血液浄化法の開発を目指し、肝解毒機能を持たせた細胞を構築することを目的とした。具体的な肝解毒機能として、薬物代謝活性を選択し、薬物代謝遺伝子(P450 CYP3A4)を含むベクターを構築し、肝由来 HepG2 細胞に導入した。構築した細胞株における薬物代謝能を検討した結果、薬物代謝誘導剤を用いる場合には活性は 2-4 倍程度しか上昇しなかったが、遺伝子組換えにより、ヒト初代肝レベルの薬物代謝能を実現できた。

A. 研究目的

本研究では、バイオ血液浄化法の開発を目指し、肝臓の解毒機能を持たせた細胞株を構築することを目的とした。本年度は、薬物代謝能に注目し、肝由来 HepG2 細胞株の薬物代謝能の上昇について検討した。

B. 研究方法

薬物代謝酵素誘導実験に関しては、ヒト肝薬物代謝誘導薬である rifampicin を様々な濃度に添加し、testosterone 6 β -hydroxylation 活性を測定した。また、グルタミン合成酵素遺伝子と薬物代謝酵素遺伝子ヒト CYP3A4 遺伝子を含む pBudCE4-GS-CYP3A4 ベクターを構築し、これを用いて、肝由来の HepG2 細胞株を形質転換し、細胞株を構築した。

C. 研究結果

肝臓の薬物代謝能は、薬物代謝誘導薬によってその活性が上昇することが知られている。そこで、肝由来の 3A4 活性誘導剤として知られている rifampicin を添加することにより、薬物代謝誘導について検討した。Rifampicin 濃度を 0-200 μ M に変化させて薬物代謝を検討した。その結果、HepG2 細胞株では 100 μ M において 2.3 pmol min⁻¹ mg-protein⁻¹ の活性となり、添加しない場合に比較して 4 倍の活性上昇が見られたが、200 μ M ではその誘導レベルは減少した。また、グルタミン合成酵素を組み込んだ GS-HepG2 細胞株に関しては 50 μ M において 1.1 pmol min⁻¹ mg-protein⁻¹ の活性となり、添加しない場合に比較して約 1.6 倍の活性上昇となった。しかし、このレベルはいずれもヒト初代肝(生体より単離 24 時間後 *Journal of Hepatology* 31 : 549 (1999))の値 250 pmol min⁻¹ mg-protein⁻¹ と比較して非常に低い値であった。

そこで、さらに活性上昇を目指して、グルタミン合成酵素遺伝子と薬物代謝酵素遺伝子ヒト CYP3A4 遺伝子を含む pBudCE4-GS-CYP3A4 ベクターを構築し、これを用いて、肝由来の HepG2 細胞株を形質転換し、細胞株を構築した。構築

した細胞株の testosterone 6 β -hydroxylation 活性を測定した結果、約 490 pmol min⁻¹ mg-protein⁻¹ となり、ヒト初代肝と同等の活性を持たせることが可能であった。

D. 考察

Rifampicin による薬物誘導を用いて 3A4 活性の上昇を試みたが、その活性レベルはヒト初代肝に比較して低いレベルであった。薬物誘導の手法では、薬物代謝能をヒト肝に近いレベルにまで上昇させることは難しいと考えられる。一方、遺伝子組換えの手法を用いることにより、ヒト初代肝レベルの薬物代謝能を細胞株に持たせることは可能である。また、初代肝の場合は薬物代謝活性は時間と共に減少するが、構築した細胞株の代謝活性は安定であった。

E. 結論

肝臓の解毒機能を持たせた細胞株を構築することを目的とし、肝臓の薬物代謝能に注目し、肝由来 HepG2 細胞株の薬物代謝能の上昇について検討した。その結果、薬物代謝誘導剤を用いる場合には活性は 2-4 倍程度にしか上昇しなかったが、遺伝子組換えにより、ヒト初代肝レベルの薬物代謝能を実現できた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 大政健史、菅健一 蛋白質・核酸・酵素 45:2188-2194, (2000)
- 2) T. Yoshikawa *et al.* Cytotechnology 33:37 -46 (2000)
- 2) T. Yoshikawa *et al.* Biotechnology Progress, 16: 710 -715 (2000)

2. 学会発表

- 1) T. Omasa *et al.* YABEC 2000, Nov. 5-7, Fukuoka
- 2) K. Kim *et al.* JAACT 2000, Nov. 17-21, Fukuoka
- 3) 大政ら 日本農芸化学会 2001 年度大会, 3 月 24-27 日, 京都

分担研究者 自治医科大学教授 藤村昭夫

研究要旨：抱合型ビリルビンは肝において産生され、MRP (multidrug resistance-related protein) の一種であるMRP-2によって胆汁中へ排泄される。現在までにMRP-2の安定発現能を持った上皮細胞作成は様々なグループの試みによっても成功していない。そこで、安定した機能発現の可能な上皮細胞を作成のために、MRP-2以上に抱合型ビリルビン輸送能の高いヒト遺伝子を探索・同定した。

A 研究目的

抱合型ビリルビンは肝において産生され、MRP (multidrug resistance-related protein) の一種であるMRP-2によって胆汁中へ排泄される。現在までにMRP-2の安定発現能を持った上皮細胞作成は様々なグループの試みによっても成功していない。そこで、MRP-2以上に抱合型ビリルビン輸送能の高い遺伝子を探索し、安定した機能発現の可能な上皮細胞を作成し、さらにハイブリッド型人工臓器へ応用するため、以下の検討を行った。

B 研究方法

MRP-2と共通の膜貫通部位をもつホモロジーcDNAをgene bankよりスクリーニングし、ヒト脳より未知遺伝子として登録されていたクローンを発見し全長を求めた。さらに、機能をXenopus oocyte発現系で解析した。

C 研究成果・考察

このcDNAは約6Kb、アミノ酸としてMRP-2と25%の相同性を持ち、機能をXenopus oocyte発現系で解析したところ、Estradiol- β -glucuronide輸送能は対照の100倍以上であった。また $K_m=30 \mu M$ 、 $V_{max}=8.4 \text{ pmol/hr/egg}$ とMRP-2とほぼ同等であった。ATP依存性や阻害薬に対する反応性も他のMRP familyの中で、最もMRP-2に近かった。現在、これをヒト腎由来細胞に導入し機能解析中である。ノーザンブロットによると、この遺伝子は肝、腎にも本来発現しているものであり、腎細胞などへの安定発現系を作成するにはMRP-2より容易であろうと考えている。

D 結論

MRP-2類似の機能をもつヒト由来の新規遺伝子を同定した。今後これを用いて安定発現上皮を作成する予定である。

E 研究発表

1. 論文発表

Tsuruoka, S., Osono, E., Nishiki, K., Kawaguchi, A., Arai, T., Saito, T., Takata, T., Sugimoto, K., Kurihara, S., Fujimura, A. Removal of digoxin by column for specific adsorption of B2-microglobulin, - a potential use for digoxin intoxication. Clin. Pharmacol. Ther. in press. 2001

2. 学会発表

1. 鶴岡秀一、杉本孝一、藤村昭夫、今井正、浅野泰、武藤重明. マウス近位尿管におけるMDRを介した薬物分泌。第43回日本腎臓学会学術総会。2000年5月11-13日、名古屋。

2. 鶴岡秀一、藤村昭夫、今井正。ホロファイバー型モジュールによるMDR基質薬物の除去。(シンポジウム) 第43回日本腎臓学会学術総会。2000年5月11-13日、名古屋。

3. 鶴岡秀一、大藪英一、杉本孝一。荒井龍彦、齋藤鉄男、古吉重雄、高田覚、栗原怜、藤村昭夫。 β 2-ミクログロブリン吸着カラム(リクセル)によるジゴキシン吸着。第45回日本透析医学学会学術集会、総会。2000年6月16-18日、福岡。

松村外志張

明治乳業(株)細胞工学センター(現(株)ローマン工業細胞工学センター)

要旨: 血液浄化能を付与したハイブリッド型補助人工臓器の技術開発を目的として、前年度までに探索した細胞固定化基質の機能性検討を終了し、2相性を有する細胞リアクター装置の設計、試作を進めた。基質膜の探索の結果、多孔性ポリテトラフルオロエチレン膜(ePTFE)が、布帛よりも変形性も少なく、細胞層を形成させたときに細胞層に破壊がおきにくいことが判明した。さらに各種のePTFE膜について検討した結果、平均孔径10ミクロンから0.1ミクロンの範囲で、単層の細胞層が形成されたが、とくに平均孔径1ミクロンの膜で、均一性の高い細胞層が形成されることが判明した。

血液浄化能を付与したハイブリッド型補助人工臓器の技術開発を目的として、前年度までに探索した細胞固定化基質の機能性検討を終了し、2相性を有する細胞リアクター装置の設計・試作を進めた。さらに試作した多数の装置について培養細胞を搭載してその装置構造上の問題点の解決に努め、最終年度において予定されているリアクターの機能性評価に備えて装置の改良を行った。

本研究において、生体内で肝細胞が担っている毒性物質の解毒機能ならびに腎の近位尿細管細胞が担っている代謝産物の排出機能の機能を人工的な細胞リアクター内に発現させるために、肝細胞としてHepG2ヒト肝癌由来細胞株を、腎近位尿細管細胞株としてPCTL家兎細胞株をモデル細胞として選択している。

これら細胞の生育が可能で、かつPCTL細胞については基質膜に層状に増殖して界面を形成し、代謝産物の膜を介する能動的な排出を可能とするとともに、HepG2細胞は基質膜の他の面に付着して増殖し、血液中の老廃物を代謝、また栄養物質の新生を行わしめることを可能とする2相性の細胞リアクター装置を設計ならびに製作することが分担者の課題である。

前年度までにPCTL細胞を単層に増殖させるばかりでなく各種の培養細胞の付着増殖を可能とし、しかも人工臓器材料として必要な強度と柔軟性を有する基質膜として、ナイロンならびにポリエステル混紡の極微細繊維布帛に適性を認め、特許出願を行った。今年度、この出願にさらに検討を加えて再度出願を行った。

一方、この基質膜を使用してPCTL細胞の培養を行い、細胞層の特性を検討したところ、細胞層に微細な空隙が生じ膜を通じての液の漏洩を皆無にすることが困難であることが判明した。これは膜基質の変形性が細胞層の変形性より大きいために変形によって細胞層に破壊が起きるためであるものと推察された。さらに基質膜の探索を加えた結果、先に我々が細胞固定化基質として検討したことがある多孔性ポリテトラフルオロエチレン(ePTFE)膜が布帛よりも変形性も少なく、細胞層を形成させたときに細胞層に破壊がおきにくいことが判明した。さらに各種のePTFE膜について検討した結果、平均孔径10ミクロンから0.1ミクロンの範囲で、単層の細胞層が形成されたが、とくに平均孔径1ミクロンの膜で、均一性の高い細胞層が形成されることが判明した。

ePTFE膜上にMDR遺伝子を導入したPCTL細胞を増殖させた微小なモジュールについて高分子物質に対する膜の非透過性ならびにジゴキシンをモデル物質とした薬剤の能動輸送性を確認し、リアクターの構築を開始した。

細胞リアクターとしては、定量的なデータの解析が可能な平膜型のリアクターであって、1枚の膜面積を約200(約10⁷細胞を搭載可能)とし、膜を重層することが可能な設計とした。多数の試作品を製作し、PCTL細胞を搭載することによってリアクターとしての問題点の解決を進めた。解決すべき問題点としては、泡の発生、培養液の漏洩、膜のたわみによる細胞層の剥離、細胞を播種した場合の不均一性、等々である。今年度内、これら問題をほぼ解決し、平成13年度におけるリアクター機能の検討ならびに動物実験に備えた。なお、デッドボリュームの削減と膜のたわみによる細胞の剥離とは相反する関係にあり、平成13年度において装置の改良を継続する予定である。

なお、並行して、細胞リアクターの基本技術に関する研究、ならびにヒト組織・細胞の研究利用に関わる法・倫理・安全の分析、ならびにバイオテクノロジー分野での取り扱いが同意書によって許された公共性のある組織バンクの構築の試みを行い、わが国の医療分野における今後のバイオテクノロジーのさらなる展開に備えた。

共同研究者

高村政範、廣田・岩井美子、中道昇(明治乳業(株)細胞工学センター)、佐々木博子((株)ローマン工業細胞工学センター)、高橋正浩(ハイテック(株)横浜研究開発センター(業務委託))

<今年度の学会発表、論文ならびに特許出願による成果報告>

1.細胞リアクター/人工臓器の技術開発ならびに技術評価

A.学会発表

1)大政健史、金和美、平松慎也、山中貢、谷村奈緒子、片倉啓雄、岸本通雅、菅健一、松村外志張、絵野沢伸、鈴木盛一、雨宮浩、ハイブリッド型人工肝補助システムに適したアンモニア代謝細胞の構築とその機能評価。日本農芸化学会(2001.3京都)日本農芸化学会誌 75:91(2001)

B.論文

1)T Miyashita, S Enosawa, S Suzuki, A Tamura, H Tanaka, H Amamiya, T Matumura, T Omasa, K Suga, T Aoki, Y Koyanagi. Development of a Bioartificial Liver With Glutamine Synthetase- Transduced Recombinant Human Hepatoblastoma Cell Line, HepG2. Transplantat in Proceedings, 32,2355-2358(2000)

2)芝良昭、向山俊之、王春仁、大山寿恵、張清、絵野沢伸、松村外志張、児玉亮。ポリアミノ酸-ウレタン共重合体をコートしたPTFE不織布による肝細胞の培養。化学工業論文集 27(1), 134-136(2000)

3)Nakamichi N, Ito M, Maeda T, Matsumura T. Detection and cDNA cloning of H-strand mitochondrial regulatory region RNAs in cultured cells and human tissues. Cytotechnology 33: 175-188, 2000.

4)S Enosawa, T Miyasita, XK Li, S Suzuki, H Amamiya, T Omasa, K Suga, T Matumura. Bioreactor with glutamine synthetase- transfected recombinant HepG2 cell exhibits the ammonia removal activity needless of adding cofactors and substrates. -advantage of cellular bioreactor that surpass enzyme-immobilized beads-. J. Artif. Organs. in press.

C.特許出願

1)中道昇、廣田美子、伊藤真美子、前田拓志、巖華、松村外志張。真核細胞用制御配列ならびに組換え発現ベクター PCT/JP00/03956(2000)

2)松村外志張、高村政範、絵野沢伸、鈴木盛一、雨宮浩、吉田典雄。極細繊維布帛を基材とする動物細胞固定化技術。特願 2001-078910(2001)

3)松村外志張、高村政範、絵野沢伸、鈴木盛一、雨宮浩。人工血液出願準備中

2.ヒト組織・細胞利用の社会的受容性ならびに研究用ヒト組織資源の開発

A.学会発表

1)絵野沢伸、松村外志張、宇都木伸、鈴木盛一、雨宮浩、川城信子。摘出扁桃リンパ組織バンク試行からの問題提起。組織培養研究 19:62(2000).

B.論文

1)絵野沢伸、鈴木盛一、雨宮浩、土橋信明、川城信子、宇津木伸、高村政範、松村外志張。公共的な研究用ヒト組織バンク設立のための検討-国立小児病院における摘出ヒト扁桃リンパ組織構築の試み-。組織培養研究 19:163-183(2000)

C.翻訳

1)松村外志張、崎川尚美(翻訳)。研究使用目的でのヒト組織細胞と生命材料(M.R.C 作業部会1999.11.報告書)。組織培養研究 19:139-162(2000)

D.総説

1)宇津木伸、迫田朋子、恒松由記子、野本亀久雄、唄孝一、増井徹、松村外志張。ヒト組織・細胞の取り扱いと法・倫理。ジュリスト No.1193:2-35(2001.2.1).

2)T Matsumura. Ethical considerations on the use of human tissues and cells in non-clinical science, technology and practice -from the discussion at the Japanese Tissue Culture Association Committee for Ethical Issues. Altern. Animal Test. Experiment. 7(2-3):71-74(2001).

3)松村外志張、増井徹、宇都木伸。ヒト組織・細胞取り扱いに関する倫理的諸問題。バイオ医薬品の品質・安全性評価。エル・アイ・シー(出版)2000.3.23

20000481

以降は 雑誌/図書等に掲載された論文となりますので P.1~P.2 の
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。

