

ピーク時の産生量は平面培養時の約6倍を示す(図2A, B)。RFB培養したOUMS-29/H-11細胞ではCYP3A4タンパク質が検出され、CYP3A4の基質として知られているテストステロンを負荷すると、その代謝中間体である6 β -ヒドロキシテストステロンが検出される(図1C, D)。このOUMS-29/H-11細胞をRFBから取り出してプラスチックディッシュに継代したところ、3次元構造を保持した3日間は酵素活性を認めたが、継代によって単層になると活性を失った。つまり高密度3次元培養により肝細胞本来の丸い形態を維持し、細胞間相互作用が増加することが、CYP3A4酵素活性発現に重要な役割を担っていると考えられる。ヒトのCYP3Aは、CYP全体の薬物代謝の45-60%を担う大変重要な酵素であり、新規開発薬物の評価には必要不可欠である。

図 ヒト不死化肝細胞(OUMS-29)のRFB3次元高密度培養。(A)RFBの細胞培養部分(リアクター)。矢印は、培地の流れる方向を示す。(B)リアクターに充填したガラスビーズ細胞担体の表面に重層化して増殖したOUMS-29細胞。その細胞表面は多数の微絨毛で覆われている。(C)リアクター内の様子。培養後、増殖したOUMS-29細胞によりビーズが黄褐色に見える。

図1

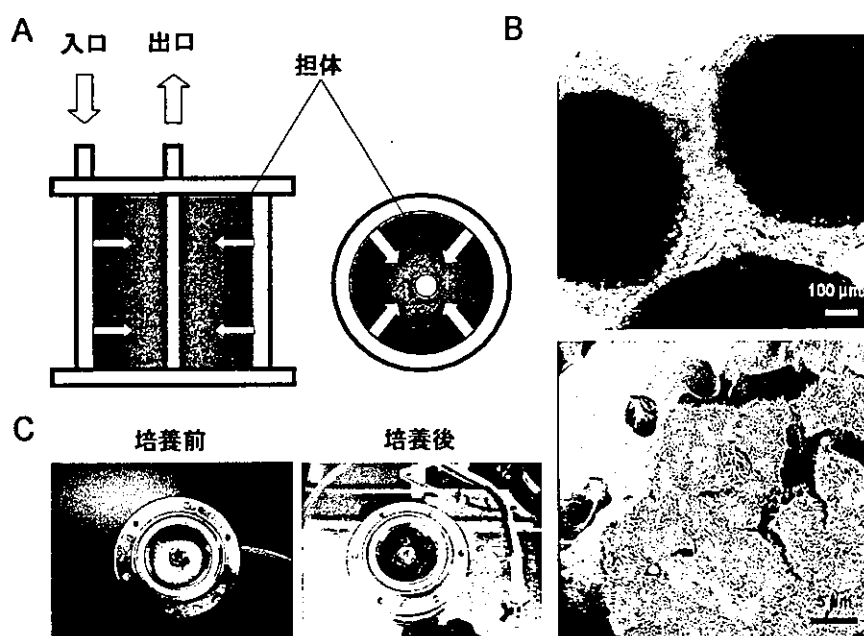
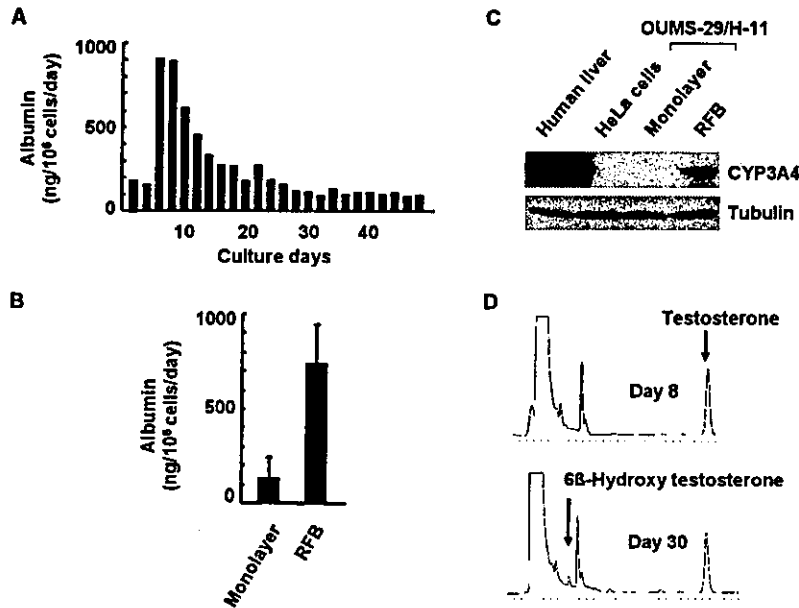


図1. ヒト不死化肝細胞(OUMS-29)のRFB3次元高密度培養。(A)RFBの細胞培養部分(リアクター)。矢印は、培地の流れる方向を示す。(B)リアクターに充填したガラスビーズ細胞担体の表面に重層化して増殖したOUMS-29細胞。その細胞表面は多数の微絨毛で覆われている。(C)リアクター内の様子。培養後、増殖したOUMS-29細胞によりビーズが黄褐色に見える。



D. 考察

1. ヒト肝・胆系細胞の保有する機能を樹立培養細胞株のなかに存在することを証明した。これらの特徴を利用して多くの研究者に利用され始めた。細胞バンクに登録した十株以上の細胞は、今後さらにその培養時の安定な性格よりより多くの研究目的に利用されるであろう。これらを追跡し利用範囲を調査し、詳細な報告書の作成が次に待たれる。

2 & 3. ヒト肝・胆系細胞の機能発現は、培養時3次元の展開があつて初めて、その機能発現が増強される。適切な培養環境は立体的構築のほか、結合した細胞間の培養液の栄養や酸素が均等に流通し、重力加重が平均化された状況、すなわちラジアルフロー型バイオリアクターが機能の維持と長期培養が可能な培養方法として優れていると考えられる。

E. 結論

ヒト肝細胞由来の樹立株細胞は、その培養環境の改善を行うことにより、多くの正常細胞が本来保有していた機能を発現する。とくに、3次元展開により培養を行う、ラジアルフロー型バイオリアクターとの組み合わせは優れた培養方法である。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. Tsuboi S, Y, Nagamori S, et al., Anti-endostatin monoclonal antibody enhances growth of human hepatocellular carcinoma cells by inhibiting activity of endostatin secreted by the transplanted cells in nude mice.

Int J Oncol. 2004 ;25:1267-71.

2. Akiyama I, Nagamori S, et al., Expression of CYP3A4 by an immortalized human hepatocyte line in a three-dimensional culture using a radial-flow bioreactor. Int J Mol Med. 2004;14:663-8.

3. Miyazaki M, Nagamori S, Huh NH. et al., Involvement of interferon regulatory factor 1 and S100C/A11 in growth inhibition by transforming growth factor beta 1 in human hepatocellular carcinoma cells. Cancer Res. 2004, 15;64:4155-61

H.. 知的財産権の出願・登録状況

発明の名称：肝炎ウイルスの増殖方法及び装置

発明者：永森静志

出願人：科学技術振興事業団

特許出願日：2002年8月21日

国際出願番号：PCT/JP00/05582

国際特許公開 WO01/014517 肝炎ウイルスの増殖方法及び装置

発明の名称：ハイブリッド型人工肝臓

発明者：永森静志、旭メデカル

本稿は、岡山大学分子細胞生物研究所の宮崎正博助教授、秋山一郎助手の協力をえた。さらにピッツバーグ大学 Gerlach 教授の支援に感謝します。

ヒト組織の研究資源化に関する研究

分担研究者 小林 真一 聖マリアンナ医科大学 薬理学 教授

研究要旨

ヒト組織の研究資源化を目的として、聖マリアンナ医科大学病院で肝臓癌および肝疾患の外科手術適応患者より文書で同意を得て、手術時に摘出した肝臓組織の疾患部位（癌部位）および非疾患部位（正常部位）を採取し、肝組織から初代肝細胞を単離し培養を行った。この初代肝細胞が生体内の肝機能を反映するかどうか薬物代謝酵素活性やその他の肝特異的転写因子の発現について検討した。本年度は、初代肝細胞の培養条件の違いについて比較し、薬物代謝酵素活性の維持を目的とした初代肝細胞の長期培養について検討した。その結果患者の病態、肝組織の摘出部位そして培養条件により薬物代謝酵素活性に影響を与えることがわかった。また癌部位組織から癌細胞の単離培養を行い、抗癌薬の効果を評価することを試みた。薬物の効果・副作用などの評価を検討するための研究に適した肝組織の機能を維持した質の高い、生存率の高い肝細胞を維持するシステムの構築を目指している。

A. 研究目的

ヒト組織を利用した研究は、医薬品の研究開発に必要不可欠である。また薬物の効果や副作用に重要な役割を担っている肝薬物代謝酵素の働きは、人種間での違いが明らかになり、日本人の組織を用いた検討が重要になってきている。

聖マリアンナ医科大学（以下、本学）では学内ヒト組織バンクシステムを構築すべく検討してきた。本学病院において肝臓癌および肝疾患の外科手術適応患者より文書で同意を得て、手術時に摘出した肝臓組織の疾患部位（癌部位）および非疾患部位（正常部位）の一部を採取し、個人情報情報の漏洩防止のために匿名化を行う（個人情報管理者）。また生命倫理委員会の承認を得た上で研究に利用する。この時、採取した肝組織

が十分量である場合は、初代肝細胞に単離し培養する。この肝細胞を利用して、抗癌薬またはその他の薬物に対する効果を調べる。はじめに、この初代肝細胞が生体内の肝機能をどの程度反映するかどうか薬物代謝酵素活性やその他の転写因子、蛋白の発現について検討する。さらに薬物の効果・副作用などの研究可能な肝組織の機能を維持した質の高い、生存率の高い細胞を維持するシステムを構築し、細胞バンクに供給することを目的としている。

B. 研究方法

（非癌部位肝組織の初代培養）

採取した肝組織は氷冷培養液（HANK'S）に入れ一時保存した。直ちに肝組織は細切後コラゲナーゼで 37°C 15 分間酵素処理を

し、初代肝細胞を単離した。単離した肝細胞はフィルターで不純物を除去した後遠心し、FCS（牛胎児血清）添加培養維持因子 William E 液に浮遊させ細胞数を算定した。細胞数を $5 \times 10^5/\text{ml}$ に調整し、poly-L-lysine コーティング 24 穴プレートにて、 $37^\circ\text{C}5\%$ CO_2 下で培養した。

24 時間静置後、培養液を FCS 添加群、非添加群、ヒト血清添加群の 3 群に分け培養し経過観察した。細胞生存率は MTS assay にて検討した。

（肝薬物代謝酵素の蛋白発現）

初代肝細胞は経時的に一部回収し、肝機能の指標として薬物代謝酵素である CYP3A4 の発現について検討した。肝細胞 CYP3A4 mRNA 発現は RT-PCR 法で、CYP3A4 蛋白は免疫細胞染色で解析した。また、CYP3A4 活性はルシフェラーゼ発光法で測定した。

（癌部位肝組織の初代培養）

採取した癌部位の肝組織は氷冷培養液（HANK'S）に入れ一時保存した。抗生物質添加 HANK'S 内で 1 時間静置後、組織を細切した。組織はフィルターで不純物を除去した後遠心した。回収した細胞は算定後 10cm シャーレで 10%FCS 添加 DMEM 液で培養した。

（倫理面への配慮）

本学においては、三省共同のガイドライン「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に則した生命倫理委員会があり、本研究はその生命倫理委員会で審査、承認後、治療目的で外科手術により肝組織の切除を受ける患者を対象としている。事前に臨床試験コーディネーターが十分な補助説明をした後、文書

による同意を得た。患者の個人情報個人情報管理者を置き、連結可能または不可能匿名化を行い、個人情報の厳密な管理を行った。

C. 研究結果

1) 肝細胞培養の確立

今年度は、本大学病院で肝疾患および肝癌で手術を受けた患者 11 例（女性 5 名、男性 6 名、年齢 61.4 ± 12.3 歳；原発性肝癌 3 例、胆管癌 3 例、転移性肝癌 3 例、その他 2 例）より採取した肝組織を初代肝細胞培養に使用した。採取した肝組織は、病理医の協力のもと病理診断に用いる部分を除いた残余部分を研究に使用できるシステムにしたため、約 1g から 3g を培養に用いることが出来るようになった。

初代肝細胞の長期培養と薬物代謝酵素活性の維持を目的とするため、培養維持因子添加 William E 液にさらに非添加群、FCS 添加群、ヒト血清添加群の 3 群に分け培養し経過観察した。ヒト血清添加群では非添加、FCS 添加群と比較して細胞生存率が高かった。

培養細胞は時間経過をおって一部回収し、薬物代謝酵素（CYP3A4）活性、mRNA および蛋白発現を検討した。単離直後の初代培養肝細胞は同じ肝組織からの mRNA および蛋白はとほぼ同程度発現していた。しかし培養 2 日目からは非添加群、FCS 添加群ともに mRNA 発現、蛋白発現が低下する傾向を示したが、ヒト血清添加群では培養 2 日目までは維持された。

2) 癌部位肝組織の初代培養

癌部位の採取は、本学病院で転移性肝癌および原発性肝癌で手術を受けた患者 4 例（原発性肝癌 2 例、転移性肝癌 2 例）より採取した肝組織について患者由来癌細胞培

養を試みた。4 例中 3 例は採取した組織の状態も悪く、癌細胞株が樹立されなかったが、1 例については細胞分裂能の活発な癌細胞株の樹立に成功し、長期培養が可能であった。癌細胞株の性状は、腫瘍マーカーが発現 (α -フェトプロテイン) し、癌細胞の活性化に伴う転写因子 p53, NF κ Bなどを発現していた。今後樹立した患者由来癌細胞株に各種抗癌薬を添加し、細胞増殖抑制反応およびアポトーシスの効果を評価するシステムを構築する。この株の一部は細胞バンクに寄与する予定である。

D. 考察

初代肝細胞培養を行うためには採取した肝組織が約 1 g 以上あることが望しいため、病理医の協力のもと、診断に必要な量の組織採取を行った上で、なるべく多くの残余部分を研究かつ培養に使用できるシステムに改善した。

また患者の病状によって肝組織自体が脂肪肝または高齢による肝の線維化を認めたときは、細胞の生存率は低く肝薬物代謝酵素活性も低いため研究には使用しにくい。このことも含め、肝細胞の初代培養の確立までにはいくつかの問題点がある。初代肝細胞の薬物代謝酵素活性を維持した長期培養を行うために、FCS 添加およびヒト血清の添加で培養条件をかえ比較すると、ヒト血清添加培養による細胞生存率が高かった。しかし、CYP3A4 発現との関連性はまだ検討中である。

平均的に培養開始 4 日目までは細胞の生存は可能であるが、細胞単離方法も含め CYP3A4 活性について生体内の機能を維持した状態での培養方法を確立すべく改善していくことが重要である。さらにその測定法も確立することが今後の課題である。

癌細胞株の樹立については、癌組織の病態(壊死を含む)にかなり左右されるため、樹立が困難であるが、樹立可能な細胞株については、各種抗癌薬の効果を評価するシステムを確立して行く予定である。

E. 結論

本大学病院で肝疾患および肝癌で手術を受けた患者 11 例の切除肝から、肝細胞初代培養を施行した。初代培養肝細胞の細胞生存率の上昇は、ヒト血清の添加が有効であった。今後の課題は、ヒト血清の添加と CYP3A4 活性の維持との関連性を検討することが必要である。

F. 研究発表

(学会発表)

1. N. Matsumoto, T. Kumai, Y. Takeba, M. Watanabe, K. Kamio, R. Taniguchi, Y. Koitabashi, S. Kobayashi Transcriptional regulation of CYP3A7 by p53 ASCPT 2004 Annual Meeting
2. K. Kamio, T. Kumai, N. Matsumoto, Y. Takeba, S. Sekine, R. Taniguchi, S. Kobayashi. Apoptosis in anti-tumor effect of irinotecan is mediated by p53 in human hepatocellular carcinoma cell line ASCPT 2004 Annual Meeting
3. Y. Takeba, T. Kumai, N. Matsumoto, S. Sekine, K. Kamio, S. Kobayashi. Possible effects CYP3A4 enzyme activity regulation of serum condition change used for culture of Huh7 cells and human primary hepatocytes. CPT2004.
4. S. Sekine, Y. Takeba, T. Kumai, N. Matsumoto, Y. Koitabashi, S. Kobayashi Apoptosis is suppressed by MDR-1 over expression induced by SN-38

in human hepatocellular carcinoma cells
CPT2004.

5. 中谷祥子、熊井俊夫、武半優子、櫻井志穂子、田中正巳、小林真一. 研究用ヒト組織バンクへヒト組織を提供する医療機関での臨床試験コーディネーターの役割. 第 25 回日本臨床薬理学会年会.

6. 谷口良子、熊井俊夫、渡辺実、神尾浩司、小林真一. CYP2C8 と CYP3A4 による paclitaxel 代謝の個体差と遺伝子多型の関係. 第 25 回日本臨床薬理学会年会.

G. 寄与細胞株

転移性肝癌患者由来細胞株 2 本 (予定)

H. 知的所有権の出願・取得状況

特になし