



Cellartis® Power™ Primary HEP Medium —ヒト初代肝細胞の長期培養を可能にする新しい培地—

- ヒト初代肝細胞の生存率と良好な細胞形態を 4 週間維持
- 長期間培養後のヒト初代肝細胞は、アルブミン分泌能の他、CYP 活性や CYP 発現誘導能など毒性・代謝試験に必要な機能についても安定保持



原文はこちら >>

<https://www.takarabio.com/learning-centers/stem-cell-research/stem-cell-technical-notes/long-term-human-primary-hepatocyte-culture>

この TECHNICAL NOTE は、上記 Web サイトに掲載されている情報を日本語訳として編集したものです。本文書に含まれるライセンス、著作権、および商標に関する情報は www.takarabio.com をご参照ください。

はじめに

肝臓は、主に肝実質細胞から成る重要な臓器であり、タンパク質合成やさまざまな代謝物の解毒など、500 を超える機能を担っている。肝細胞機能を利用した薬物代謝、薬物相互作用、薬物候補の安全性評価、疾患モデリングなどの *in vitro* 評価系には、ヒト初代肝細胞がこれまで汎用されてきた。しかし、ヒト初代肝細胞には、*in vitro* で培養すると急速に機能が失われるという大きな使用上の制限があるため (Richert et al. 2006)、その応用範囲は限定的であった。こうしたヒト初代肝細胞の問題点を解決する手段として、細胞外マトリックスのオーバーレイによる 3D サンドイッチ培養 (Liu et al. 1999)、バイオリアクター (Hoffman et al. 2012)、3D スフェロイド培養 (Proctor et al. 2017) が開発された結果、一部の肝細胞機能が数週間維持できるようになった。しかしながら、これらの培養システムの複雑さが主な要因となり、適用可能な *in vitro* アッセイの種類が制限されるなど、ヒト初代肝細胞の制約を完全に克服したとは言い難い状況である。加えて、これらの培養システムには、特別な培養機材や装置が必要となる場合があり、様々なドナーから得たヒト初代肝細胞に普遍的に適用できるわけではなかった。

こうした背景を踏まえ、通常の 2D 培養によるヒト初代肝細胞の長期培養を可能にするため、当社では Cellartis Power Primary HEP Medium を開発した。本培地は、細胞外マトリックスのオーバーレイやサンドイッチ培養を必要とせず、高い生残率と機能を保持したヒト初代肝細胞を通常の 2D 培養下で最長 4 週間維持することができるため、上記で述べたヒト初代肝細胞の使用上の制限を大幅に改善することが可能である。さらに、推奨の培養スケジュールでは、週末の培地交換は必要なく、週 3 回（月・水・金）の培地交換のみで、長期間のヒト初代肝細胞の培養が実現できる。



結果

Cellartis Power Primary HEP Mediumによる初代ヒト肝細胞の生存率と細胞形態の長期間維持

初代肝細胞の長期培養には、細胞生存率の維持が必須要件となる。そこで、長期培養中の細胞生存率が良好に維持されたことを確認するため、異なる6名のドナーに由来する凍結初代肝細胞（メーカー4社から購入）を各メーカーのプロトコルに従って解凍およびプレートに播種し、4時間後にCellartis Power Primary HEP Mediumに交換し、さらにその4時間後（0日目）、1、7、14、21、28日目に細胞由来のATP量を測定した。その結果、解凍後7日目から28日目の細胞由来ATP量は安定しており、大きな変動は見られなかった。すなわち、肝細胞の生存が解凍後4週間良好に維持されていたことが確認された（図1）。また興味深いことに、解凍後4時間から7日目の間でATP量の増加が認められ、その増加量についてはドナー間でばらつきがみられたが、これはおそらく、ドナー間で回復期の状態が異なるためだと考えられる。

ATP量による細胞生存評価

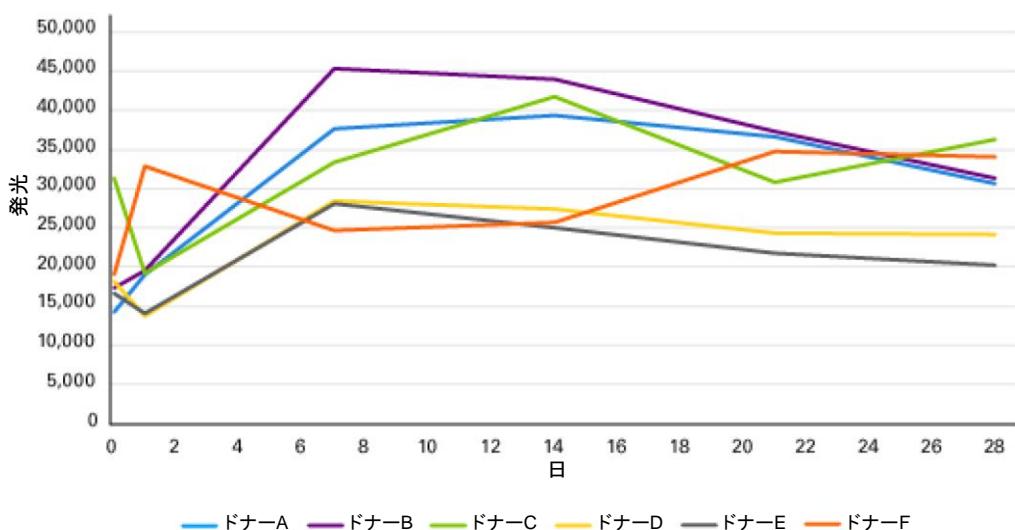


図1. Cellartis Power Primary HEP Mediumで培養した初代肝細胞のATP量

ヒト初代肝細胞（6名のドナー、異なるメーカー4社から入手）を、メーカーのプロトコルに従って解凍およびプレーティングした後、解凍4時間後に、Cellartis Power Primary HEP Mediumに交換した。培地交換の4時間後（0日目）、1日目、7、14、21、28日目に細胞由来のATP量をCellTiterGloアッセイを用いて測定することにより、培養中の細胞の生存状態を評価した。データは各ドナー（3つのtechnical triplicate）の平均値として示す。

次に、長期培養中のヒト初代肝細胞の成熟状態を示す重要な指標である細胞形態の変化を確認するため、Cellartis Power Primary HEP Mediumまたは異なるメーカー3社から入手した維持培地でヒト初代肝細胞を4週間培養し、顕微鏡観察した。得られた位相差像より、Cellartis Power Primary HEP Mediumで培養したヒト初代肝細胞は、培養28日後でも典型的な成熟肝細胞の形態を示した。すなわち、細胞は多角形であり、細胞間には明瞭な白色の境界と、二核性の細胞も確認された（図2、パネルA）。これに対して、他社の培地で培養したヒト初代肝細胞では、急速に成熟肝細胞の形態は失われ、死細胞様の形態へと変化することが確認された（図2、パネルB）。

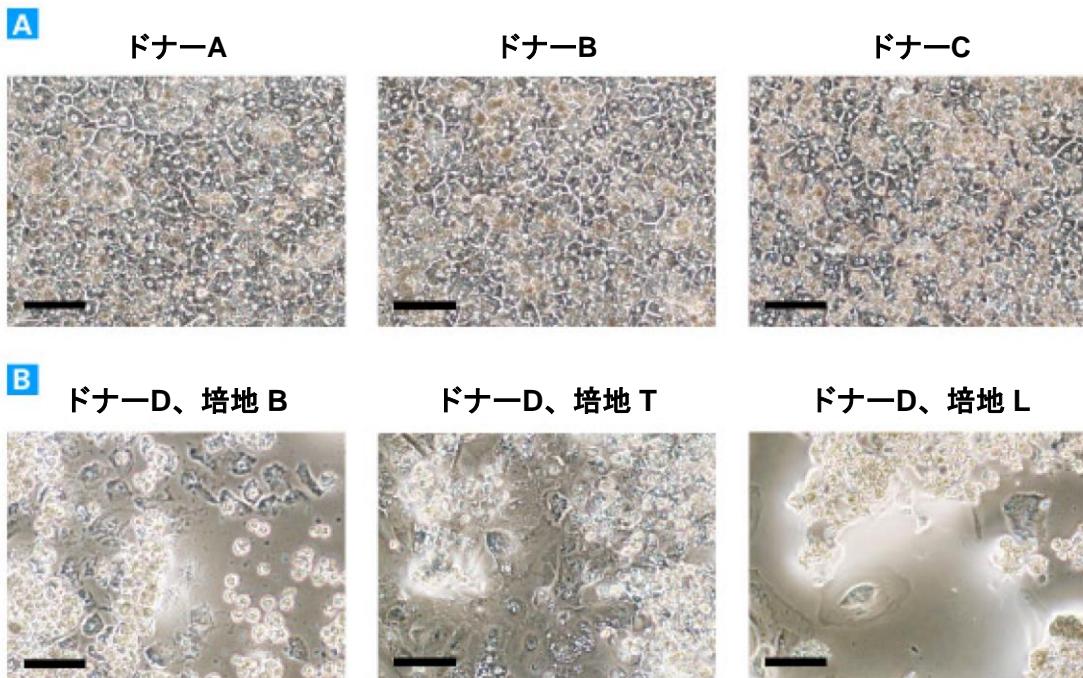


図 2. Cellartis Power Primary HEP Medium および 3 種類の市販の肝細胞維持培地で培養した初代肝細胞の解凍後 28 日目の形態（スケールバーは 100 μm ）

パネル A：ヒト初代肝細胞をメーカー推奨のプロトコルに従って解凍およびプレート播種し、4 時間後に Cellartis Power Primary HEP Medium に交換し、28 日間培養した後の細胞形態（3 名のドナー（A, B, C）について示す）。

パネル B：ドナー D 由来の細胞を、メーカー B、メーカー T、またはメーカー L の培地で 28 日間培養した後の細胞形態。

Cellartis Power Primary HEP Medium によるヒト初代肝細胞のアルブミン分泌能長期間（4 週間）維持

Metabolic zonation のモデルでは、肝葉中の細胞の位置により肝細胞の機能分化(functional specialization)が生じることが提唱されている (Jungermann and Kietzmann 2000)。すなわち、このモデルでは、アルブミンは主に門脈周囲帯にある肝細胞より分泌される一方、シトクロム P450 (CYP) 酵素を介した薬物代謝は、静脈周囲帯に位置する肝細胞がその役割を担うとされている。

ヒト血漿の主要なタンパク質であるアルブミンの分泌機能は、特に門脈周囲の肝細胞機能に注目した *in vitro* 肝細胞モデルの評価の指標として広く用いられる。Cellartis Power Primary HEP Medium で培養した初代肝細胞では、培養 1 日後からアルブミンが分泌されるだけではなく、28 日間の培養期間を通じてアルブミン分泌が安定して維持されることが示された（図 3）。また興味深いことに、総アルブミン分泌量は 28 日間を通じて安定していたのに対し（図 3、パネル A）、細胞総タンパク質量については 1 日目から 7 日目まで増加していた。そのため、アルブミン分泌量を細胞総タンパク質量で正規化したアルブミン量は培養開始直後に低下し、一定レベルに到達後は 28 日目まで安定に維持された。また培養開始直後のタンパク質量の増加は、解凍およびプレート播種後の回復期に関連した現象であることが想定される。

以上の結果より、Cellartis Power Primary HEP Medium で培養されたヒト初代肝細胞は、最長 28 日間にわたり、機能を保持した肝細胞の重要な指標であるアルブミンを分泌し続けることが確認された。

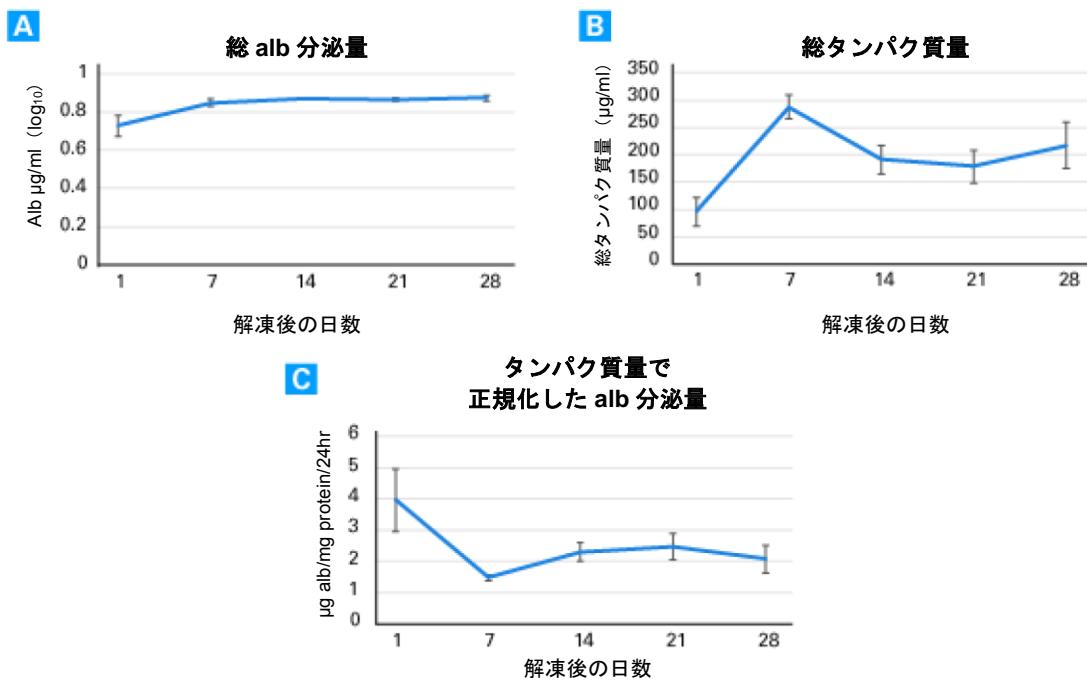


図 3. Cellartis Power Primary HEP Medium で培養した初代肝細胞におけるアルブミン (alb) 分泌
ヒト初代肝細胞 (6 名のドナー、メーカー4 社から入手) を、メーカーのプロトコルに従って解凍およびプレート播種した後、4 時間後に Cellartis Power Primary HEP Medium に交換した。すべてのグラフのデータは、各ドナー ($n = 6$) の平均値士標準偏差として示す。
パネル A : 24 時間に培地中に分泌されたアルブミンを、解凍後 0~1、6~7、13~14、27~28 日目に ELISA で測定した。
パネル B : 1 ウエルあたりのタンパク質量を、Pierce BCA Protein Assay kit を用いて定量化した。
パネル C : アルブミン分泌量を総タンパク質量で正規化。

Cellartis Power Primary HEP Medium によるヒト初代肝細胞中 CYP 活性の長期間 (4 週間) 維持

肝細胞のもつ他の主要な機能として、薬剤化合物の解毒機構において重要な薬物代謝酵素 CYP の発現および活性維持が挙げれる。本機能は静脈周囲帯の肝細胞にて保持され、*in vitro* 肝細胞モデルの機能性を評価する指標として用いられている。異なるメーカー4 社から入手した 6 名のドナーに由来する初代肝細胞を Cellartis Power Primary HEP Medium で培養し、主要な 5 種の CYP 酵素の活性を 4 週間評価した。解凍 4 時間後 (0 日目)、および 1、7、14、21、28 日目に CYP 活性を測定し、そのレベルを細胞総タンパク質量で正規化した。その結果、4 週間の培養期間を通して、6 名のヒト初代肝ドナー全てで CYP 活性が維持され、解凍後 7 日目から 28 日目までは極めて安定に維持されていたが (図 4)、培養開始後 7 日間については、その変動は大きかった。これは解凍後の回復期の状態がドナーによって異なるためだと考えれる。また、ヒト生体における個人差と同様に、CYP 活性のばらつきが異なるドナー由来の肝細胞間でも観察され、このばらつきは 28 日間の培養期間を通じて維持された。

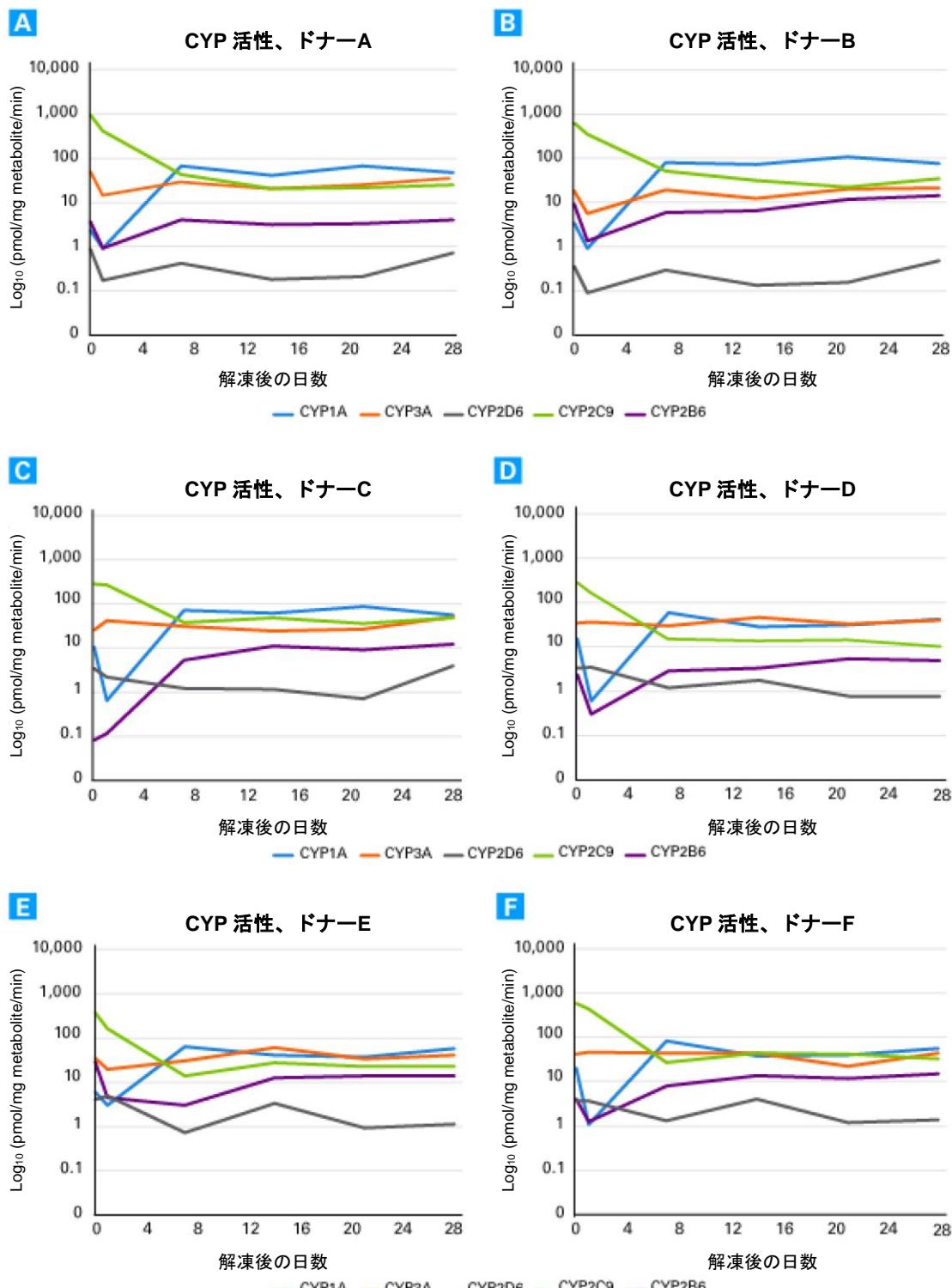


図 4. Cellartis Power Primary HEP Medium で 28 日間培養した初代肝細胞の CYP 活性

パネル A~F: ヒト初代肝細胞（6名のドナー、メーカー4社から入手）をメーカーのプロトコルに従って解凍およびプレートに播種し、4時間後（0日目）、1、7、14、21、28日目にCYP活性を測定した。CYP活性測定は、各CYP由来の特異的代謝物（CYP1A = パラセタモール、CYP3A = OH-ミダゾラム、CYP2C9 = OH-ジクロフェナク、CYP2B6 = OH-ブロピオン、CYP2D6 = OH-Bufuralol）の生成を、液体クロマトグラフィー／質量分析（LC/MS）で測定することによって行い、得られた代謝物の濃度は、タンパク質質量および活性測定時間で正規化した。データは、n=3で測定した値の平均値を示す。



Cellartis Power Primary HEP Medium で培養したヒト初代肝細胞の性能を他の市販肝細胞維持培地で培養したヒト初代肝細胞と比較するため、異なる 2 名のドナーに由来する初代肝細胞を、Cellartis Power Primary HEP Medium またはメーカー 3 社から入手した肝細胞用培地で培養した。本検討においても、Cellartis Power Primary HEP Medium で培養したヒト初代肝細胞は 28 日間にわたり CYP 活性を維持した（図 5、パネル A）。これとは対照的に、他の市販培地で培養したヒト初代肝細胞では CYP 活性が急速に低下した（図 5、パネル B～D）。以上の結果より、これまで初代肝細胞の維持に用いられてきた培地と比べて、Cellartis Power Primary HEP Medium は、ヒト初代肝細胞の CYP 活性レベルを長期間安定に維持することが確認された。

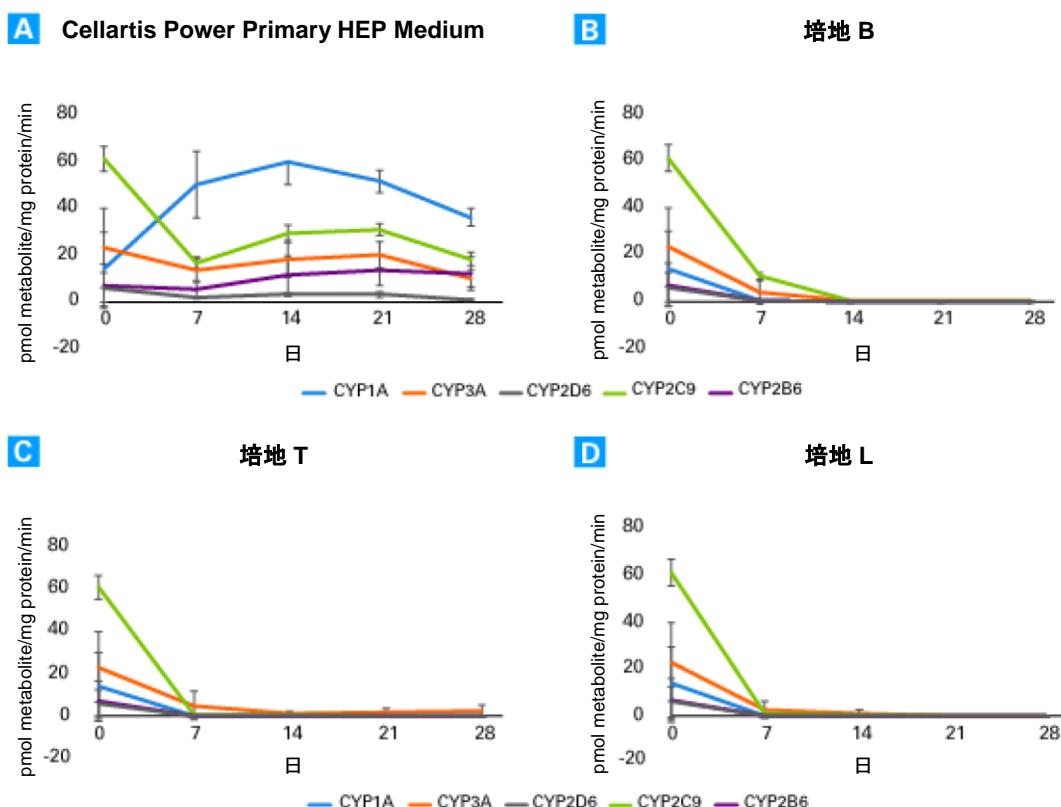


図 5. Cellartis Power Primary HEP Medium および 3 種類の市販の肝細胞維持培地で培養した初代肝細胞における CYP 活性。

異なる 2 名のドナーに由来するヒト初代肝細胞を、各メーカーのプロトコルに従って解凍およびプレートに播種した後、Cellartis Power Primary HEP Medium（パネル A）またはメーカー B の培地（パネル B）、メーカー T の培地（パネル C）、メーカー L の培地（パネル D）で培養した。プレーティングの 4 時間後（0 日目）、7、14、21、28 日目の CYP の活性は、特異的代謝物（CYP1A = パラセタモール、CYP3A = OH-ミダゾラム、CYP2C9 = OH-ジクロフェナク、CYP2B6 = OH-ブロピオノン、CYP2D6 = OH-Bufuralol）の生成量を LC/MS で測定することによりそのデータを取得した。得られた代謝物の濃度をタンパク質量および活性アッセイ時間で正規化し、データは $n = 2$ の平均値±標準偏差として示した。

Cellartis Power Primary HEP Medium によるヒト初代肝細胞の CYP 誘導能長期間（4 週間）維持

特定の薬剤が、mRNA 発現のレベルで CYP 活性を上昇させる効果をもつことが知られており、この薬剤による CYP 発現誘導効果が、特に複数の薬物を服用する患者に深刻な副作用を及ぼすことが危惧されている。したがって、薬剤の開発過程では、潜在的な薬物相互作用による毒性の評価が必要とされており、本毒性評価にはヒト初代肝細胞が標準的に用いられている。

肝細胞の持つこの重要な機能が Cellartis Power Primary HEP Medium で培養したヒト初代肝細胞で維持されるかどうかを評価するため、26 日間培養したヒト初代肝細胞を代表的な CYP 誘導剤（表 I）で 48 時間曝露後、28 日目に CYP1A2、2B6、2C9、3A4 の mRNA 発現を解析し、DMSO で処理した陰性対照の細胞中に発現した各 mRNA の発現量と比較した。

CYP	誘導剤
1A2	オメプラゾール (Ome)
2B6	フェノバルビタール (PB)、リファンピシン (Rif)
2C9	フェノバルビタール (PB)、リファンピシン (Rif)
3A4	フェノバルビタール (PB)、リファンピシン (Rif)

表 I. 3 種の代表的な誘導剤により誘導される CYP 酵素

その結果、試験した 4 種類の CYP 全てについて、26 日間培養後の初代肝細胞においても、高いレベルの発現誘導能が維持され（図 6）、解凍後 2~4 日目のヒト初代肝細胞を用いて得られた誘導倍率と同等の発現誘導能（Yajima et al. 2014）が保持されていることが確認された。

なお、Rif による CYP2C9 の誘導がドナー A でのみ認められなかった点については（図 6、パネル D）、これまでに報告されているドナー由来の個人差（Yajima et al. 2014）を反映した結果であることが示唆される。

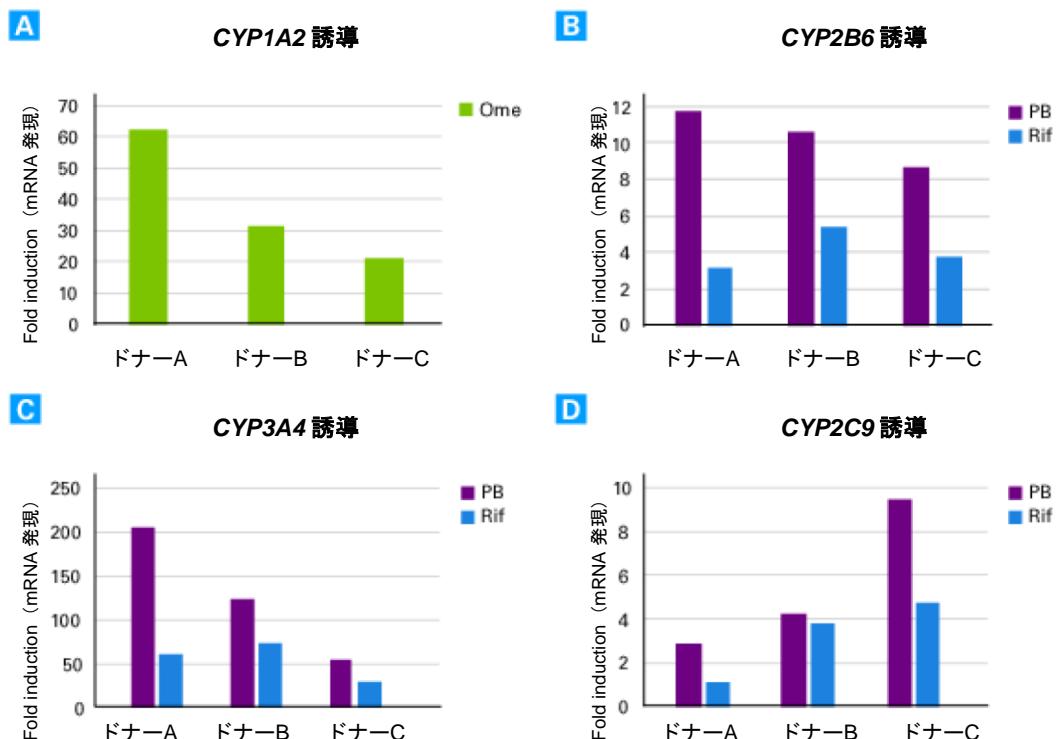


図 6. Cellartis Power Primary HEP Medium で培養した初代肝細胞における CYP mRNA 発現の誘導

3 名のドナーのヒト初代肝細胞を Cellartis Power Primary HEP Medium で 26 日間培養し、その後、25 μM オメプラゾール (Ome)、1 mM フェノバルビタール (PB)、50 μM リファンピシン (Rif)、および 0.2% DMSO (陰性対照) で 48 時間処理した。28 日目に細胞を回収し、Ome に反応した CYP1A2 の発現（パネル A）、PB および Rif に反応した CYP2B6 の発現（パネル B）、PB および Rif に反応した CYP3A4 の発現（パネル C）、PB および Rif に反応した CYP2C9 の発現（パネル D）を qRT-PCR により測定し、陰性対照と比較した。CYP レベルは DMSO 処理した陰性対照と比較した fold induction で示す（各ドナーにつき n = 1）。



まとめ

初代肝細胞は、これまで肝臓研究に汎用されてきたが、通常の 2D 培養での維持期間が非常に短いことから、その利用範囲は制限されてきた。また、この短い培養維持期間のために、慢性毒性や薬物クリアランス実験などの長期間の培養を必要とするアッセイには利用が困難であった。今回、当社が新たに開発した **Cellartis Power Primary HEP Medium** では、生存率の高い初代肝細胞を、アルブミン分泌、CYP 活性、CYP 誘導能などの肝細胞の主要な機能を保持したまま 4 週間に渡り通常の 2D 培養環境下で維持できることが確認された。すなわち、肝葉の門脈周囲と静脈周囲の異なる領域にみられる 2 種類の肝細胞表現型が、通常の 2D 培養にて保持されたことは、きわめて興味深い点である。

加えて、本培地を用いた通常の 2D 培養下では、週末の培地交換作業を行うこと無く長期間の初代肝細胞維持が可能となるため、創薬や毒性試験など複数の用途において、初代肝細胞の有用性が大幅に向上することが期待される。

方法

初代肝細胞培養

異なるメーカー 4 社 (BioreclamationIVT、Lonza、Corning、および Thermo Fisher Scientific) から購入した凍結ヒト初代肝細胞を、各メーカーのプロトコルに従って解凍およびプレート播種し、解凍の 4 時間後に、上清を慎重に除去し、**Cellartis Power Primary HEP Medium** または他のメーカーの培地と交換した。Cellartis Power Primary HEP Medium で培養した肝細胞は、製品の取扱説明書に従い、2 日または 3 日ごとに培地を交換して培養した。また、他メーカーの培地で培養した肝細胞については、各メーカーのプロトコルに従って培養した。

タンパク質定量

細胞を D-PBS (カルシウムとマグネシウムを含む 1 倍 Dulbecco リン酸緩衝食塩水) で 1 回洗浄し、0.02 mM NaOH で 4°C で一晩溶解させ、解析まで -20°C で保存した。Pierce BCA Protein Assay kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて、メーカーのプロトコルに従いタンパク質量を定量化した。

ATP 定量化

CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay (Promega) を用いて、メーカーのプロトコルに従い、ヒト初代肝細胞を解凍後、継時的に生存率を測定した。測定の結果得られた発光値は、ブランクの値を差引いて定量に用いた。

アルブミン分泌

初代肝細胞から分泌したアルブミンを、解凍後複数の時点で解析した。24 時間のコンディショニング後に培地を回収し、Albuwell kit (Exocell) を用いてメーカーのプロトコルに従ってアルブミン量を解析し、1 ウェルあたりの総タンパク質量で正規化した。

CYP 誘導

解凍後 26 日目から 28 日目までの CYP 誘導を評価した。ヒト初代肝細胞を、0.1%ペニシリーストレプトマイシン (PEST) および HCM SingleQuots (GA1000 およびヒドロコルチゾンを含まない) を含有する William E 培地で、誘導剤であるオメプラゾール (25 μM)、フェノバルビタール (1 mM)、リファンピシン (50 μM)、DMSO (0.2%、陰性対照) とともに 24 時間培養した後、更に 24 時間、誘導剤を含有しない培地で培養した。得られた細胞を RNA 保護試薬 (Thermo Fisher Scientific) を用いて回収し、全 RNA を抽出後、cDNA 合成反応と qPCR に用いた。



CYP 活性アッセイ

初代肝細胞の CYP 活性を、解凍後、継時に解析した。特異的な代謝物 [パラセタモール／アセトアミノフェン (CYP1A)、OH-ブプロピオン (CYP2B6)、4-OH-ジクロフェナク (CYP2C9)、OH-Bufuralol (CYP2D6)、および 1-OH-ミダゾラム (CYP3A)] の生成を、LC/MS を用いて測定した。LC/MS 解析は Pharmacelsus GmbH で行った。0.1% PEST を含有するフェノールレッドを含まない William E 培地で細胞を慎重に 2 回洗浄した。次に、0.1% PEST、25 mM HEPES、2 mM L-Glutamine、およびカクテルプローブ基質を含有する、フェノールレッドを含まない William E 培地を培養面積 1 cm²あたり 110 µL 加えて活性アッセイを開始した（下の表 II 参照）。37°C での 2 時間のインキュベーション後に、100 µL の上清を回収し、LC/MS 解析まで -80°C で保存した。LC/MS で測定した代謝物の濃度を、1 ウェルあたりのタンパク質の量 (Pierce BCA Protein Assay Kit で測定) およびアッセイ時間 (120 分) で正規化した。

CYP	薬物の基質	代謝物
3A4/5	ミダゾラム	α-OH-ミダゾラム
2D6	Bufuralol	1'-OH-bufuralol
2B6	ブプロピオン	(2S,3R)-OH ブプロピオン
2C9	ジクロフェナク	4'-OH-ジクロフェナク
1A	フェナセチン	パラセタモール

表 II. 試験した CYP 酵素で薬物の基質から產生される代謝物

参考文献

- Hoffmann, S. A. et al. Analysis of drug metabolism activities in a miniaturized liver cell bioreactor for use in pharmacological studies. *Biotechnol. Bioeng.* **109**, 3172–81 (2012).
- Jungermann, K. & Kietzmann, T. Oxygen: modulator of metabolic zonation and disease of the liver. *Hepatology* **31**, 255–60 (2000).
- Lim, Y.-P. & Huang, J. Interplay of pregnane X receptor with other nuclear receptors on gene regulation. *Drug Metab. Pharmacokinet.* **23**, 14–21 (2008).
- Liu, X., Chism, J. P., LeCluyse, E. L., Brouwer, K. R. & Brouwer, K. L. Correlation of biliary excretion in sandwichcultured rat hepatocytes and in vivo in rats. *Drug Metab. Dispos.* **27**, 637–44 (1999).
- Proctor, W. R. et al. Utility of spherical human liver microtissues for prediction of clinical drug-induced liver injury. *Arch. Toxicol.* **91**, 2849–2863 (2017).
- Richert, L. et al. Gene expression in human hepatocytes in suspension after isolation is similar to the liver of origin, is not affected by hepatocyte cold storage and cryopreservation, but is strongly changed after hepatocyte plating. *Drug Metab. Dispos.* **34**, 870–9 (2006).
- Yajima, K. et al. Evaluation of 23 lots of commercially available cryopreserved hepatocytes for induction assays of human cytochromes P450. *Drug Metab. Dispos.* **42**, 867–71 (2014).