

創薬スクリーニング用小型肝細胞培養キットの商品化

清水 恒子 [株式会社プライマリーセル製造部／部長]

三高 俊広 [札幌医科大学フロンティア医学研究所組織再生学部門／教授]

谷水 直樹 [札幌医科大学フロンティア医学研究所組織再生学部門／講師]

金濱 吉範 [株式会社プライマリーセル／製造部]

背景・目的

小型肝細胞は、共同研究者の三高らが発見した肝前駆細胞の一つで、高い増殖能と分化機能を持ち、肝細胞の重要な機能であるシトクロム P450(CYP)など薬物代謝酵素活性の発現・誘導が可能である。

申請者は昨年度の研究開発助成事業により小型肝細胞を用いた創薬スクリーニング用キットの開発を行っており、既にマススクリーニングへの対応と輸送方法の確立に成功している一方で、商品化に向けては製品仕様の検討や、販売資料として細胞機能評価データの蓄積などが必要である。

本研究では昨年度までの研究成果をもとに創薬スクリーニング用小型肝細胞培養キットの完成と、製品ラインナップ拡充を目指し、新たな目的の小型肝細胞製品を検討することを目的とした。

内容・方法

(1) 凍結小型肝細胞の培養と成熟化

凍結小型肝細胞を培養し、細胞の増殖と成熟化の過程について位相差顕微鏡にて観察した。

(2) 細胞輸送試験

製品の輸送を想定して、32°C 定温輸送容器による輸送を行い、到着後の細胞培養プレートの状態や輸送容器内の温度変化について確認した。輸送中の培養液漏れを防止するため、従来より用いてきたアルミシールテープによるプレート密閉方法の他に、より操作性の高いことが期待されるヒートシーラーによるプレートシールについて検討した。

(3) CYP 誘導試験

小型肝細胞の機能評価として、オメプラゾールおよびフェノバルビタールの添加による CYP 誘導試験を行った。成熟化誘導を行った小型肝細胞を用いて、輸送試験後到着翌日を Day0 として、図1に示した4スケジュールで薬剤処理を行い、薬剤による反応について遺伝子発現解析を行った。薬物添加開始後の培養期間を最長で 14 日間とし、従来の初代肝細胞では不可能であった長期培養における薬物反応性についても検証した。

(4) 小型肝細胞による毛細胆管形成試験

小型肝細胞評価の新たなアプリケーションとして、小型肝細胞の毛細胆管形成と Fluorescent Diacetate (FD) の代謝・排泄能について観察した。

結果・成果

(1) 凍結小型肝細胞の培養と成熟化

播種直後の様子を観察した結果、播種細胞数を増やしたことによりウェル間の細胞数のバラつきが少なくなっていた。播種翌日の細胞接着と、その後の増殖は前回と同様に良好であった。Matrigel による成熟化誘導後も順調に経過し、小型肝細胞が成熟していく際に見られる細胞がもりあがった様子も確認できた(図2)。

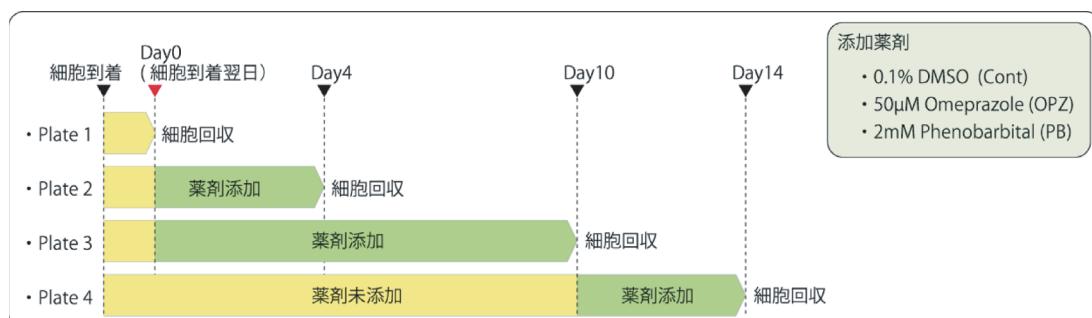


図1. 薬剤処理のスケジュール



図2 小型肝細胞写真(左:播種翌日、中:Matrigel 添加前(成熟化誘導前)、右:Matrigel 添加後7日目)

前回に比べて播種細胞数を倍増させた結果、細胞の接着・増殖・成熟化には特に問題なかった。製品製造の観点から評価したところ、培養期間を短縮することにより納期短縮と経費削減に繋がることから、今回同様1wellあたりコロニー20個の細胞数で播種することとした。

(2) 細胞輸送

プレートシール方法を検討した結果、ヒートシールの方がアルミシールテープを用いるよりも作業性がよく、時間が短縮された(図3)。

しかしながら、輸送後に到着したプレートを確認した結果、ヒートシールで輸送したプレートは、96ウェル中、数個のウェル内の培養液の色が、他のウェルと比較しアルカリ側を示す赤色を呈していた(図4)。プレートシールの一部にごくわずかな隙間があり、それ

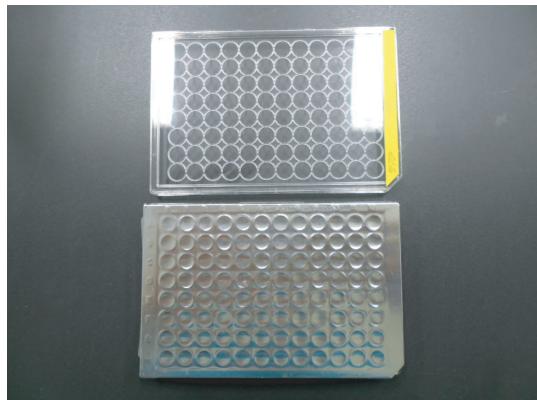


図3. プレートシール(上：アルミシールテープ、下：ヒートシーラー)

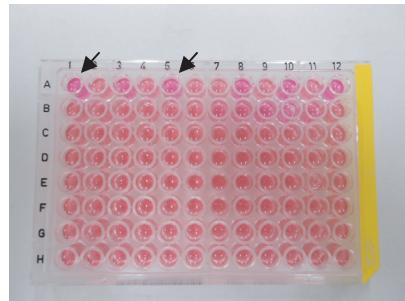


図4. 輸送後のプレート
(ヒートシーラー使用)

によって空気が出入りしていたことから起きたものと考えられた。

ヒートシールは作業性が良好であったが、輸送後に特に問題のなかったアルミシールテープによるシールを行うこととした。

輸送時の温度を測定した結果、細胞輸送開始時から到着までの間、定温ボックス内は30.5℃～33.5℃の間で保たれていた。外気が冰点下になる冬季の輸送でも定温輸送容器の効果に問題なかった(図5)。

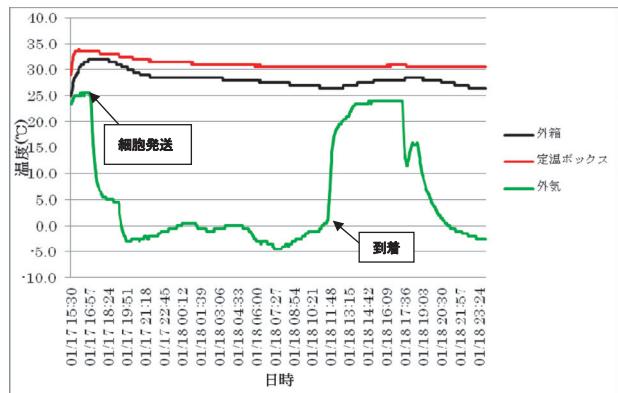


図5. 輸送中の温度推移

(3) CYP誘導試験

薬剤添加開始日から最大14日間の培養を行ったが、観察の結果、培養期間中の細胞状態は良好であった(図6)。

遺伝子発現解析の結果、肝細胞マーカーであるALBは常に高い発現量を示し、G6Paseは長期培養後も発現が見られた。

CYP1a1およびCYP1a2は全てのプレートにおいてオメプラゾール添加群での発現が高くなった。

CYP2b1では、プレート③でフェノバルビタール添加群、プレート④ではフェノバルビタールおよびオメプラゾール添加群の発現が、各コントロールに比べ上昇した。

CYP3a1/23では、全てのプレートにおいて、オメプラゾール添加群およびフェノバルビタール添加群で発現が上昇した。

ALB、CYP1a、CYP3a1/23では前回の結果と同様に薬剤添加により遺伝子発現上昇が見られ、薬剤による反応性の再現が確認できた。

一方で、CYP2b1については、前回と同様の反応性は得られなかった。原因は不明であるが、それぞれのプレートでも結果が異なっており、安定した結果が得られなかった。

(4) 小型肝細胞のFD代謝・排泄能の観察

蛍光顕微鏡で観察した結果、小型肝細胞コロニー内に細胞に取り込まれ代謝された蛍光物質が光っている様子が確認された。一部は索状に延びて光っており、蛍光物質が細胞から毛細胆管へ排泄されている様子

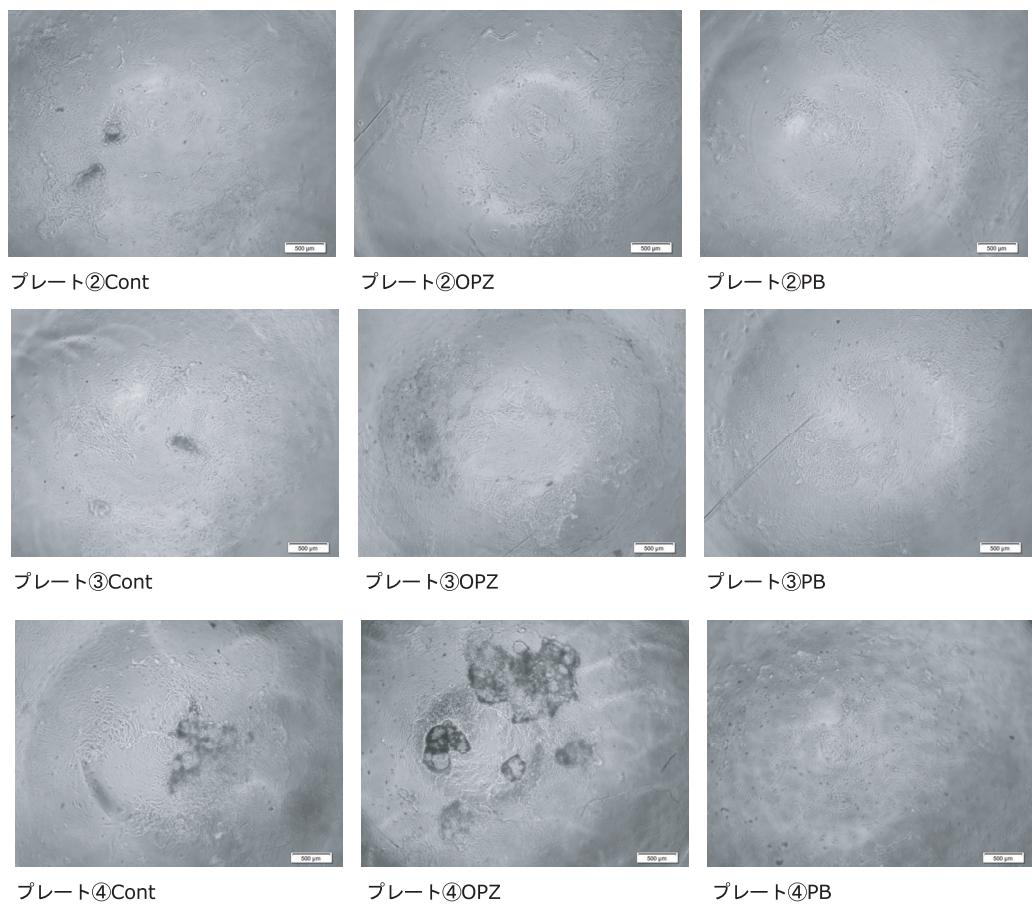


図6. 小型肝細胞写真



図7. 小型肝細胞の遺伝子発現解析結果

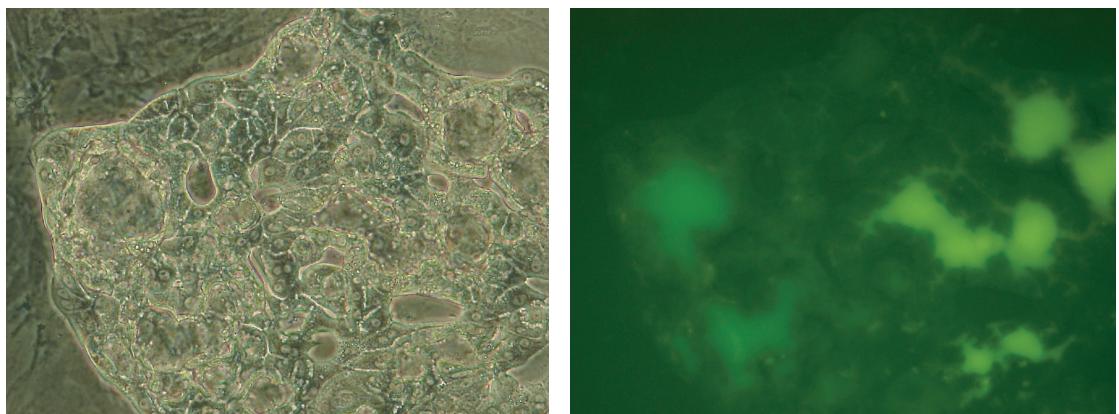


図8. Fluorescent Diacetate (FD)添加後的小型肝細胞写真

が観察され、毛細胆管網が形成され始めている様子が確認できた。

今後の展望

今回の成果により、製品仕様の検討と販売資料をそろえることができたため、2013年3月より小型肝細胞培養キットおよび培地の販売を開始し自社HPに掲載した。
(http://www.primarycell.com/hanbai/small_hepatocyte.html)

今後は、拡販に向けて既存顧客への案内やメールニュースおよび自社の販売ルートを通じたパンフレット配布などを行うほか、トライアルキャンペーン等を行い幅広いユーザーに向けて宣伝を進めたい。並行して、既存肝細胞ユーザーに対してモニターを募集し、より使いやすいキットを目指した製品の熟成を図りたい。