生産と技術　第55巻　第3号　(2003)

バイオ人工肝臓の開発を目的とした肝細胞の機能制御

研究ノート

八　木　清　仁*

Regulation of hepatocyte functions to develop Bioartificial Liver

Key Words：Bioartificial liver, dendrimer, thioredoxin, Hepatocyte spheroid, Biomaterial

第1章　緒　論

肝臓は極めて多数の生体機能を司り，ひとたび肝不全に陥ると意識障害，出血傾向，黄疸発症と様々な障害が引き起こされる．この肝臓の機能を補助あるいは代行し肝不全患者の治療に用いることを目的としてバイオ人工肝臓の開発が国内外で進められている．欧米では既にブタの細胞を用いた臨床試験が開始されている．1970年代後半にコラゲナーゼ灌流法により機能を維持した肝細胞の単離が可能となり，リアクターに肝細胞を充塡したバイオ人工肝臓の開発が盛んに行われるようになった．これまでバイオ人工肝臓が臨床で用いられた例はすべて重篤な肝疾患を起こした患者のみに用いられている．我々は産業化という観点から高機能を有し，コンパクトで安全なバイオリアクターを構築すれば適用できる肝疾患を広げることが可能と考えている[1]．また，新薬開発において薬物代謝を評価する系としても用いることができる．そこで我々は生体外へ取り出すと急速に死滅し，また著しい機能低下を起こす肝細胞の生存性，肝機能の維持を目的とした研究を継続して行ってきた．

第2章　培養基材表面への機能性付与

多くのほ乳類の細胞は足場依存性であり，接着する表面の性質により生存性，分化機能が著しく変化する．我々は肝細胞の高機能化を目的として種々の機能性培養基材に関する検討を行っている．キトサンと呼ばれる生体適合性を有した天然物由来のポリマーをグルタルアルデヒドで架橋したゲル上で肝細胞を培養すると細胞毒性が低く，球状を保ち機能発現が良好であることを見いだした．またキトサン分子中の遊離アミノ基をフルクトースで修飾すると細胞接着数が増加することを報告した[2]．これらの結果から培養基材に機能性を与える際にフルクトースが効果的なリガンドとして使用できることが明らかとなった．次に細胞の寿命や機能に影響を与える生理活性分子を高密度に導入することを目的とし樹木状多分岐高分子であるデンドリマーを用いることを試みた．ポリアミドアミンデンドリマーは3つのアミノ基を持つトリスアミノエチルアミンをコアとしてそれぞれのアミノ基に2個のトリスアミノエチルアミンを結合させ，その反応を繰り返すことにより球状のポリマーが形成される(図1)．この規則的な枝分かれ構造を有するデンドリマーを細胞培養に応用すべくまずコア部分を基材表面に固定化し末端の官能基を利用して樹木状に成長させていく．そして最後に末端の官能基に細胞の機能をモジュレートする生理活性分子をリガンドとして修飾することを試みた．理論的には1回成長させるごとに末端の官能基が倍に増加することになる．リガンドとして肝細

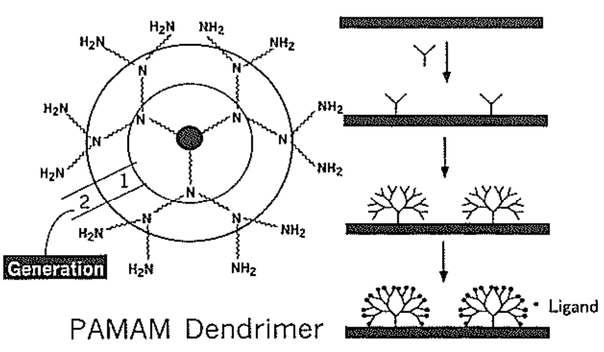

図1　デンドリマーによる培養基材への機能性付与

* Kiyohito YAGI
1952年11月生
1981年大阪大学大学院・薬学研究科・応用薬学専攻修了
現在，大阪大学・大学院薬学研究科・生体機能分子化学分野，教授，薬学博士，生物工学
TEL　06－6879－8195
FAX　06－6879－8195
E-Mail yagi@phs.osaka-u.ac.jp

胞成長因子であるGHK(glycyl-L-histidyl-L-lysine)，フルクトースを導入したデンドリマーをポリスチレンプレート上に固定し，肝ガン細胞株を播種したところ尿素合成能および薬物代謝活性が亢進することが示された[3]．次にラットから単離した初代培養肝細胞をフルクトースをリガンドとして修飾したデンドリマー(フルクトースデンドリマー)上で培養すると培養初期において，尿素合成能が促進され，アポトーシスが抑制されることが示された[4-5]．さらに培養を続けるとフルクトースデンドリマー上で肝細胞が多層集合体であるスフェロイドを形成することが観察された(図2-A)．しかしスフェロイドの性質で多層集合体を形成した後培地中に浮遊するためプレート上の細胞数が減少するという人工肝のための培養基材としては不都合なことが起こったため，接着性を基材に付与する必要性が生じた．そこで肝細胞の膜表面に存在するアシアロ糖蛋白レセプターのリガンドであるガラクトースを導入することを試みた．フルクトースとガラクトースを1:1の比で含むリガンド溶液を用いて第５世代デンドリマー(末端アミノ基：32個)を修飾した(F/Gデンドリマー)．その結果，形成されたスフェロイドは基材上に保持されフルクトースデンドリマーに比べ顕著に接着細胞数の増加が認められた(図2-B)．次に接着細胞の機能について測定したところ尿素合成能はF/Gデンドリマー上の肝細胞はデンドリマーを固定していないコントロールプレート上の細胞に比べ，６日間の培養後，単位面積あたりで約３倍，細胞あたりで約２倍の活性を示した[6]．このようにフルクトースデンドリマー，F/Gデンドリマーなどのリガンド修飾デンドリマーは培養肝細胞の細胞死を抑制し，機能を高く維持するために非常に有効な基材となることが示された．これは肝細胞の培養に留まらず，細胞の種類によって最適なリガンドを選択することによってテーラーメイドのscaffold(細胞の足場)の創製に展開が可能であると考えている．

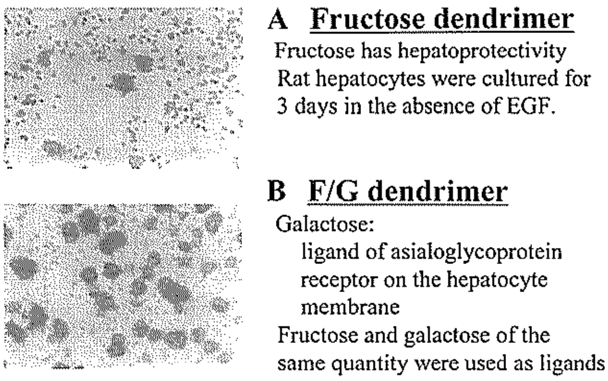

図２ デンドリマー上でのスフェロイド形成

第３章 遺伝子導入による高機能化

これまで肝ガン細胞にアンモニア代謝に関わる単一の遺伝子を導入する試みは国内の他グループにより報告されている．我々は人工肝臓が担うべき数百という肝機能を考慮し細胞全体をグローバルに活性化し，かつ細胞死に対する抵抗性を付与することを目的として遺伝子導入を試みている．

チオレドキシンと呼ばれるタンパク質はリボヌクレオチドリダクターゼの生理的還元剤として発見されたが酸化的ストレスやアポトーシスに対して抵抗性を付与するという機能が報告され注目を浴びている．我々はこのチオレドキシン遺伝子を肝細胞へ導入することにより生体外において引き起こされるストレスおよびアポトーシスに対し抵抗性を獲得させることを試みた．肝細胞は生体外では増殖が困難であること，そして遺伝子導入効率を考慮しアデノウィルスをベクターとして用いることとした．ヒトチオレドキシン遺伝子を挿入した組換えアデノウィルスを作成し(図３)ラット肝細胞へ感染させた．ヒトチ

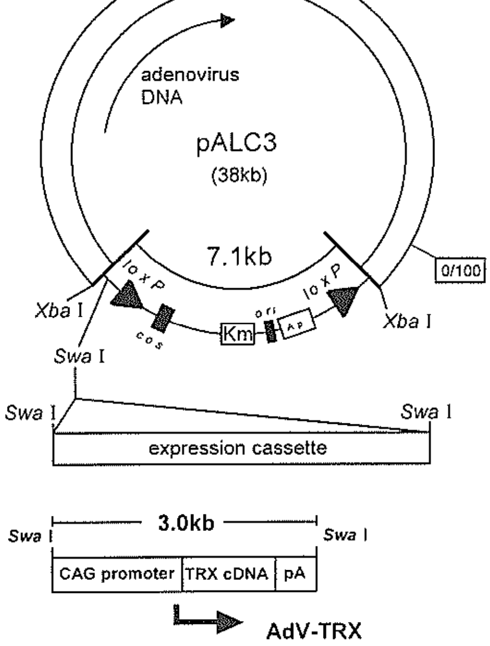

図３ チオレドキシン遺伝子導入アデノウィルスベクター

オレドキシンが発現していることをウェスタンブロットで確認後，過酸化水素処理に対する抵抗性を調べた．1mM過酸化水素で24時間処理した後，アポトーシスを起こした細胞数をFACSにより測定した．コントロールの肝細胞は約80％がアポトーシスを起こしたのに対し，チオレドキシン遺伝子を導入した肝細胞は約25％とアポトーシスに対して抵抗性を獲得したことが示された．また，通常のポリスチレンプレートで培養したときの寿命が延長されるか否かを調べたところ明らかな効果が観察された．尿素合成能も同時に維持されチオレドキシン遺伝子導入の有効性が示された．リアクターへ充填する細胞へ当該遺伝子をウィルスベクターを用いて導入することも可能であり，またチオレドキシントランスジェニック動物を作出しその肝細胞をバイオ人工肝臓に適用することも将来可能となるであろう．

引 用 文 献

1) 八木清仁，人工肝臓，*小児科診療* 64, 2207-2212 (2001)
2) Yagi, K *et al*. *Biol*. *Pharm*. *Bull*., 20, 1290-1294(1997)
3) Kawase, M. *et al*. *J.Biosci*. *Bioeng*., 88, 433-437(1999)
4) Kawase, M. *et al*. *Artif*. *Organs*, 24, 18-22 (2000)
5) Kawase, M. *et al*. *J.Biomed*. *Mater*. *Res*., 54, 519-524(2001)
6) Higashiyama, S. *et al*. *J*. *Biomed*. *Mater*. *Res*. 64A, 475-482(2003)