

ヒト肝細胞人工肝臓作製に関する基礎研究：ヒト肝腫瘍由来細胞株(HepG2, Huh 7)における細胞外マトリックス（I型コラーゲン）の肝細胞機能発現への影響に関する研究

藤井，政徳
九州大学医学部学生(6年生)

山下，洋市
九州大学大学院消化器・総合外科（第二外科）

調，憲
九州大学大学院消化器・総合外科（第二外科）

井嶋，博之
九州大学大学院化学工学部門

他

<https://doi.org/10.15017/7232575>

出版情報：福岡醫學雑誌. 92 (8), pp.299-305, 2001-08-25. Fukuoka Medical Association
バージョン：
権利関係：



ヒト肝細胞人工肝臓作製に関する基礎研究： ヒト肝腫瘍由来細胞株（Hep G2, Huh 7）における細胞外マトリックス （Ⅰ型コラーゲン）の肝細胞機能発現への影響に関する研究

¹⁾九州大学医学部学生（6年生）

²⁾九州大学大学院消化器・総合外科（第二外科）

³⁾九州大学大学院化学工学部門

藤井政徳¹⁾・山下洋市²⁾・調 憲²⁾・井嶋博之³⁾

中澤浩二³⁾・船津和守³⁾・杉町圭蔵²⁾

Basic Study about the Development of the Hybrid-artificial Liver Support System Using Human Hepatoma Cell Lines (Hep G2, Huh 7): Effects on Liver Functions by Extracellular Matrix (Type I Collagen) in Monolayer Culture

Masanori FUJII¹⁾, Yo-ichi YAMASHITA²⁾, Ken SHIRABE²⁾, Hiroyuki IJIMA³⁾,
Kohji NAKAZAWA³⁾, Kazumori FUNATSU³⁾, Keizo SUGIMACHI²⁾

*Medical Student (6th grade), Faculty of Medicine, Kyushu University¹⁾,
Department of Surgery and Science, Graduate School of Medical Sciences²⁾,
and the Department of Chemical Engineering³⁾, Kyushu University Fukuoka 812-8582*

Abstract The risk of zoonosis infections poses the greatest obstacles against the clinical application of hybrid-artificial liver support system (HALSS). To resolve this issue, we used human hepatoma cell lines (Hep G2, Huh 7) in a type I collagen-coated monolayer culture system, and analyzed liver specific functions such as ammonia removal and albumin synthesis capacity. Ammonia removal activity (nmol/10⁶ nuclei/hour) and albumin synthesis activity (μg/10⁶ nuclei/day) were upregulated in both Hep G2 and Huh 7 by type I collagen-coated monolayer culture. In particular, Hep G2 cultured in type I collagen-coated monolayer demonstrated relatively high ammonia removal and albumin synthesis capacity. These results indicate the possibility of the application of human hepatocytes to HALSS.

Key words : human hepatoma cell lines, extracellular matrix, type I collagen, ammonia removal activity, albumin synthesis activity

はじめに

肝不全患者に対する唯一の根本的治療は肝移植であるが、ドナー不足は深刻な問題であり、九州大学でも積極的に生体肝移植を行っている。しかし、劇症肝炎の場合は、脳浮腫などの重度合併症のため、移植を受けずに失する症例も少なくない。そこで、ドナーが現れるまでの生命維持や自己肝臓の再生促進による移植

の回避のため、人工肝臓の開発が切望されている。開発初期の人工肝臓は主として有毒物質を除去あるいは中和することを目的とした非生物学的なものが主流であったが、現在では発達した細胞培養技術により実現した生体肝組織の応用（分離肝細胞など）と進歩した医療機器（透析膜など）とを組み合わせたハイブリッド型人工肝臓の開発が中心である。現在、欧米ではすでにヒト肝芽腫細胞やブタ肝細胞を用いたハイブリッ

ド型人工肝臓⁴⁾¹⁸⁾が臨床応用されている。

我々は多孔質材であるポリウタレン発泡体 (PUF) 孔内で形成される肝細胞球状組織体 (スフェロイド) を利用したハイブリッド型人工肝臓を独自に開発し、その有効性をラット⁷⁾、イヌ⁸⁾、およびブタ⁹⁾で報告しており、その臨床応用に関しても九州大学医学部倫理委員会の承認を待っている状況である。

しかし、ブタ内因性レトロウイルス (PERV) が *in vitro* でヒト細胞へ感染する事¹³⁾や *in vivo* で免疫不全マウスへ感染する事¹⁷⁾が報告され、現在、異種細胞を用いることによる既知および未知の病原体感染の可能性がハイブリッド型人工肝臓の臨床応用における最大の倫理的障壁となっている。

その解決策としてはハイブリッド型人工肝臓へ初代ヒト肝細胞を使用する事が理想的であるが、移植臓器さえ不足している現状では不可能である。一方、ヒト肝腫瘍由来細胞株は *in vitro* で増殖性を有し、冷凍耐性を持つというハイブリッド型人工肝臓の細胞源として非常に高い利点を持つが、多くの肝特異機能の低下や欠損が見られるとされている⁵⁾。しかし、ヒト肝芽腫由来細胞株である Hep G2⁹⁾やヒト高分化肝細胞癌由来の細胞株である Huh 7¹⁹⁾において、肝特異機能が比較的保たれているという報告もある。よって、培養環境を変えることで肝特異機能を誘導しうれば、肝腫瘍由来細胞株はハイブリッド型人工肝臓の極めて魅力的な細胞源となりうる。

今回我々は Hep G2, Huh 7 を I 型コラーゲンをコートしたディッシュで単層培養し、プラスチックディッシュで単層培養した場合と比較して、I 型コラーゲンという細胞外マトリックスがヒト肝細胞の増殖能、肝特異機能 (アルブミン分泌、アンモニア代謝) に及ぼす効果について検討することにより、ヒト肝細胞を使用したハイブリッド型人工肝臓作製の可能性について検討したので報告する。

実験方法

①ヒト肝腫瘍由来細胞株：ヒト肝芽腫細胞株 (Hep G2) とヒト高分化肝細胞癌株 (Huh 7) は理化学研究所ライフサイエンス筑波研究センターから購入したものをを用いた。直径 92 mm の細胞培養ディッシュ (NUNC 社) にて、10% ウシ胎児血清 (FBS) (JRH BIOSCIEN-

CE 社) を添加した DMEM (Gibco 社) を基礎培地として細胞を増殖させて実験に供した。

②細胞増殖と肝特異機能評価：Hep G2, Huh 7 をそれぞれ 5×10^5 個ずつ、直径 35 mm の細胞培養プラスチックディッシュ (NUNC 社) と直径 35 mm の I 型コラーゲンでコートされた細胞培養ディッシュ (IWAKI 社) に播種した。細胞培養には、10% FBS を添加した William's E (WE) (Gibco 社) 培地を用いた。培養細胞の形態を経時的に位相差顕微鏡で観察した。アンモニア代謝能とアルブミン分泌能を検討するため、それぞれ 3 ディッシュずつ、培養 1, 3, 7, 14, 28 日目に 1 mM の塩化アンモニウムを添加し、30 分後および 24 時間後に培養上澄みを採取し、アンモニア濃度とアルブミン濃度を測定した。アンモニア濃度測定には、アンモニア測定キット (和光社) を用いてインドフェノール法で測定し、アルブミン濃度測定には AL-BWELL II キット (EXOCCELL 社) を用いて ELISA 法で測定した。反応に用いた培養ディッシュ内の肝細胞に関して、それぞれ Wezel らによる核数計数法¹⁹⁾で核数を測定した。

③統計処理：I 型コラーゲンの細胞増殖に及ぼす効果は、Hep G2, Huh 7 それぞれに関して、細胞増殖曲線を Repeated ANOVA test で検定した。アンモニア代謝能 ($\text{nmol}/10^6 \text{ nuclei}/\text{hour}$) とアルブミン分泌能 ($\mu\text{g}/10^6 \text{ nuclei}/\text{day}$) に関しては、Mann Whitney-U test で検討した。検定は p 値が 0.05 以下を有意差ありとした。

実験結果

①細胞形態と細胞増殖曲線：Hep G2, Huh 7 ともに、I 型コラーゲンコートディッシュ培養の場合の方が、若干個々の細胞の水平方向への進展が強かった。また、Hep G2 の重層化はプラスチックディッシュ培養の方が著明であった (Fig. 1A-1D)。それぞれの細胞増殖曲線を Fig. 2 に示した。Hep G2, Huh 7 ともに、I 型コラーゲンコートディッシュ培養の場合に、細胞増殖が有意に抑制されていた。

②アンモニア代謝能：培養 1, 3, 7, 14, 28 日目の培地内アンモニア濃度を比較した (Fig. 3)。Hep G2, Huh 7 ともに、培養 28 日間に渡り、培地内アンモニアを代謝し、特に Hep G2 の培地内アンモニア代謝

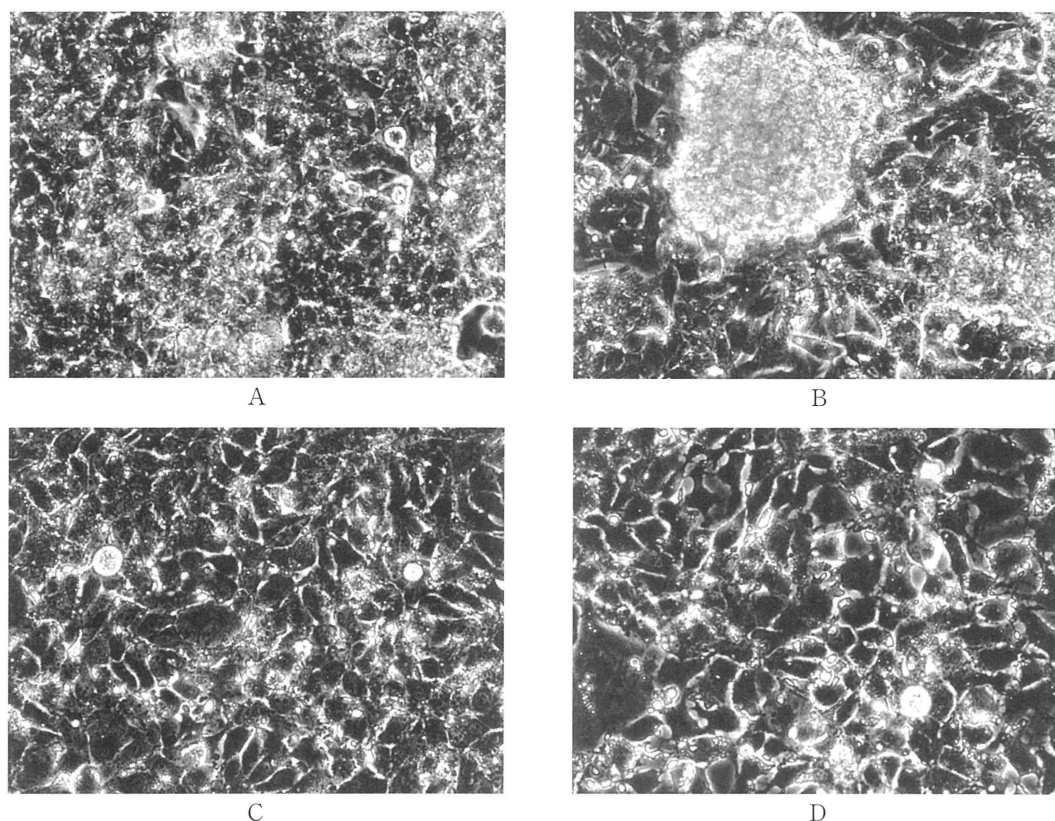


Fig. 1 Morphology of hepatocytes in monolayer culture on collagen-coated or un-coated dishes at 3 culture days
 A: Hep G2 collagen-coated
 B: Hep G2 un-coated
 C: Huh 7 collagen-coated
 D: Huh 7 un-coated

が著明であった。また、それぞれ、I型コラーゲンコートディッシュ培養において培地内アンモニア濃度の低下が強い傾向があった。この結果から得られるアンモニア代謝能 ($\text{nmol}/10^6 \text{ nuclei}/\text{hour}$) を Table 1 にまとめた。両群ともに、I型コラーゲンコートディッシュ培養において有意なアンモニア代謝能の向上が見られた。

③アルブミン分泌能：培養1, 3, 7, 14, 28日目の培地内アルブミン濃度を比較した (Fig. 4)。Hep G2, Huh 7 ともに、培養28日間に渡り、培地内にアルブミンを分泌し、特に Hep G2 の培地内アルブミン分泌の方が著明であった。また、それぞれ、I型コラーゲンコートディッシュ培養において培地内アルブミン濃度上昇が強い傾向があった。この結果から得られるア

ルブミン分泌能 ($\mu\text{g}/10^6 \text{ nuclei}/\text{day}$) を Table 2 にまとめた。両群ともに、I型コラーゲンコートディッシュ培養において有意なアルブミン分泌能の向上が見られた。

考 察

従来のプラスチックディッシュ上で単層培養された Hep G2, Huh 7 については肝特異機能が低い、又は欠損している⁵⁾とされている事や、Hep G2 由来の肝芽腫株 C3A を用いた Sussman らの人工肝臓の多施設臨床治験により、その有効性が示せなかった⁴⁾事により、ヒト肝腫瘍由来の株化細胞のハイブリッド型人工肝臓への使用は否定的な見方が強い。しかし今回、I

Table 1 Changes in ammonia removal rate (nmol/10⁶ nuclei/hour)

	DAY1	DAY3	DAY7	DAY14	DAY28
Hep G2 collagen-coated	10.4±2.60	26.7±3.03*	13.9±4.40	20.3±2.19**	25.3±1.17***
Hep G2 un-coated	7.48±2.80	9.90±0.58	5.43±2.10	7.70±0.91	8.17±0.58
Huh 7 collagen-coated	20.4±7.25*	5.98±3.72	4.30±0.32**	2.69±0.19***	3.58±0.66****
Huh 7 un-coated	6.55±3.26	1.18±0.82	1.03±0.17	0.86±0.52	0.93±0.12

Data; mean±S. D.; n=3 *, **, ***, #, ##, ###, ****; p<0.05 collagen-coated group vs un-coated group

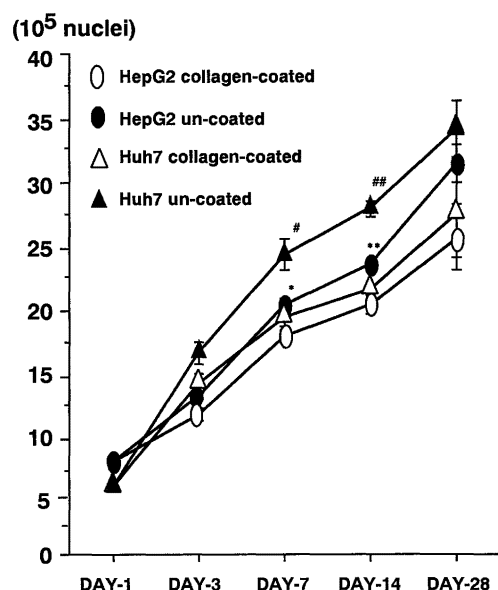


Fig. 2 Changes in number of cells in dishes (mean±S. D.; n=3) *, **, ***, #, ##, ###, ****; p<0.05

型コラーゲンコートディッシュ上で単層培養した Hep G2, Huh 7 において、細胞増殖抑制効果、及びアンモニア代謝能・アルブミン分泌能の向上を認め、特に Hep G2 では 28 日間に渡り良好なアンモニア代謝、アルブミン分泌がみられた。培養 3 日目の Hep G2 の肝特異機能は、I 型コラーゲンコートディッシュ上で単層培養したブタ初代肝細胞の約 1/4 のアンモニア代謝能（ブタ初代肝細胞は、約 100 nmol/10⁶ nuclei/hour 程度）、約 3/5 のアルブミン分泌能（ブタ初代肝細胞は約 15 µg/10⁶ nuclei/day 程度）を示した。また、Hep G2, ヒト肝細胞をコラーゲングルサンディッチ法で培養した際、アルブミン分泌能が著明に上昇したという報告もある¹⁰⁾。

ラット肝細胞の初代培養における肝特異機能の発現には、細胞外マトリックスが重要な役割を果たしてい

る²⁾。肝細胞は細胞外マトリックス蛋白と細胞表面レセプターであるインテグリンファミリーを介して接着しており、I 型コラーゲンは α1β1, α2β1, α3β1 インテグリンと接着するとされている¹⁴⁾。しかしながら、いかにして細胞外マトリックス蛋白からのシグナルがインテグリンを経由して増殖、分化などを制御する細胞内機構へ変換されるかについてはいまだ不明な点が多い。現在、インテグリンを介したシグナル伝達には二つの見解があり、一つはインテグリンが細胞形態及び細胞内骨格を調節することによりシグナルを変換するという説であり¹⁾、もう一つはインテグリン自身が細胞内にシグナルを引き起こすレセプターであり、細胞形態と機能発現は独立しているという説である²⁾。

I 型コラーゲンコートディッシュの初代ラット肝細胞や肝腫瘍株 (Huh 6, Huh 7) に対するディッシュへの接着能の向上と細胞増殖に関する促進効果が既に報告されている¹²⁾¹⁶⁾。しかし、我々の検討においては、初期播種細胞密度が高く、WE+10%FBS を培地に用いている事などのため、以前の報告との単純な比較は困難である。やはり、細胞増殖抑制と肝特異機能の向上には、上記のようなインテグリンを介したシグナル伝達が重要な役割を占めているものと考えられ、今回得られた Hep G2, Huh 7 の I 型コラーゲンコートディッシュ上で単層培養した場合の増殖抑制と機能向上に関しても、細胞骨格や細胞内シグナルの変化に関する詳細な検討が必要であり、その結果が更なる肝特異機能向上につながるものと考えられる。

今回の検討では、Hep G2 や Huh 7 などのヒト肝腫瘍由来細胞株は高い肝特異機能を示したが、ヒト肝腫瘍由来細胞のハイブリッド型人工肝臓への使用に関しては、レシピエントへ癌細胞を播種してしまう可能性が否定できない。我々は、その対策としては、あらかじめ Hep G2 や Huh 7 へ自殺遺伝子 Herpes-simplex virus thymidine kinase (HSV-tk) を、導入しておく

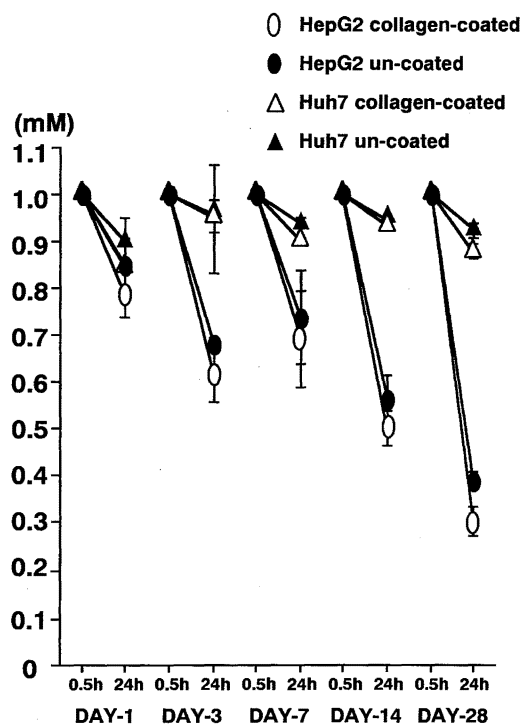


Fig. 3 Changes in ammonia concentration in the culture dishes (mean $\pm$ S. D.; n=3)

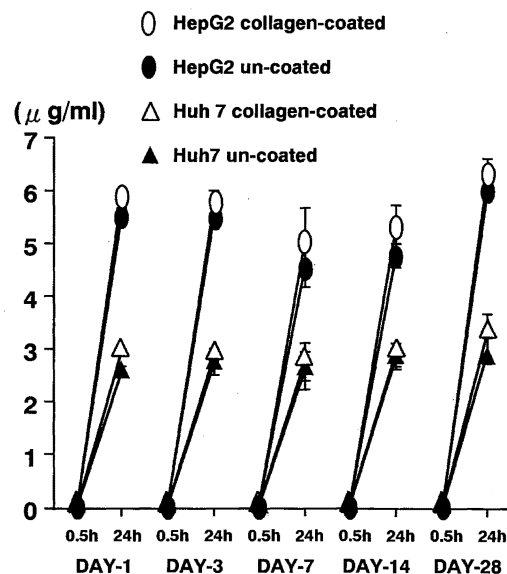


Fig. 4 Changes in albumin concentration in the culture dishes (mean $\pm$ S. D.; n=3)

Table 2 Changes in albumin synthesis rate (μ g/ 10^6 nuclei/day)

	DAY1	DAY3	DAY7	DAY14	DAY28
Hep G2 collagen-coated	14.0 $\pm$ 0.41*	9.63 $\pm$ 0.73**	5.53 $\pm$ 0.66***	5.28 $\pm$ 0.52****	5.10 $\pm$ 0.59*****
Hep G2 un-coated	6.57 $\pm$ 0.25	4.08 $\pm$ 0.17	2.22 $\pm$ 0.23	2.02 $\pm$ 0.11	1.91 $\pm$ 0.05
Huh 7 collagen-coated	9.07 $\pm$ 0.31*	4.04 $\pm$ 0.33**	2.81 $\pm$ 0.31***	2.74 $\pm$ 0.10****	2.40 $\pm$ 0.08*****
Huh 7 un-coated	3.98 $\pm$ 0.15	1.64 $\pm$ 0.18	1.06 $\pm$ 0.14	1.01 $\pm$ 0.08	0.87 $\pm$ 0.08

Data; mean $\pm$ S. D.; n=3 * , ** , *** , **** , ***** , # , ## , ### , #### , ##### ; p<0.05 collagen-coated group vs un-coated group

事を考えている。

また、今回は細胞外マトリックスとして、汎用されている I 型コラーゲンに関して検討したが、Huh 6, Huh 7 の単層培養においてフィブロネクチンコートディッシュ、及びラミニンコートディッシュで単層培養した方が高いアルブミン分泌がみられるという報告¹⁶⁾や、マウス胎児肝細胞の単層培養において、他の細胞外マトリックスに比べフィブロネクチンコートディッシュ上で培養した際、最も高いレベルでアルブミン等の肝特異的遺伝子の発現がみられるという報告³⁾があるため、今後、Hep G2, Huh 7 に関しても、他の細胞

外マトリックスコートディッシュでの培養による機能評価が必要である。

今回の検討により、Hep G2 や Huh 7 に関して、I 型コラーゲンコートディッシュ上で培養する事により、アンモニア代謝能およびアルブミン分泌能の向上を認めた事は、ヒト肝腫瘍由来細胞株においても、細胞培養環境を工夫する事で肝特異機能の向上を引き出す事が可能と考えられた。ヒト肝細胞を用いたハイブリッド型人工肝臓を作製できれば、現在ブタ肝細胞を用いたハイブリッド型人工肝臓の臨床応用で問題となっている超急性拒絶反応による急激な機能低下¹¹⁾を回避

でき、ハイブリッド型人工肝臓の適応が、急性肝不全患者から、現在 bed-ridden している慢性肝不全患者へと拡大する可能性もある。現在我々は、PUF/スフェロイド3次元培養におけるヒト肝細胞（ヒト肝腫瘍由来細胞株を含む）の機能評価をすすめている。

結 論

ヒト肝芽腫由来細胞株 Hep G2, ヒト高分化肝細胞癌由来細胞株 Huh 7 において、プラスチックディッシュ単層培養と I 型コラーゲンコートディッシュ単層培養において、肝特異機能をアンモニア代謝能とアルブミン分泌能と比較した結果、両細胞株において、I 型コラーゲンコートディッシュ単層培養によるアンモニア代謝能、およびアルブミン分泌能の向上を認めた。特に、I 型コラーゲンコートディッシュ単層培養された Hep G2 において、肝特異機能が最も高かった。

謝 辞

本研究の一部は、文部科学省の革新的技術開発研究推進費補助金（課題番号：12411）によってなされた。

参 考 文 献

- 1) Avri BZ, Gregory SR, Nancy LRB and Stephen RF: Cell-cell and cell-matrix interactions differentially regulate the expression of hepatic and cytoskeletal genes in primary culture of rat hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci* 85: 2161-2165, 1988.
- 2) Caron JM: Induction of albumin gene transcription in hepatocytes by extracellular matrix proteins. *Mol Cell Biol* 10: 1239-1243, 1990.
- 3) DiPerso CM, Jackson DA and Zaret KS: The extracellular matrix regulation of hepatic transplantation factors is dependent on cell structure. *Hepatology* 15: 1207-1210, 1992.
- 4) Ellis AJ, Hughes RD, Wendon JA, Dunne J, Langley PG, Kelly JH, Giaslason GT, Sussman NL and Williams R: Pilot-controlled trial of the extracorporeal liver assist device in acute liver failure. *Hepatology* 24: 1446-1451, 1996.
- 5) Enosawa S, Suzuki S, Kakefuda T and Amemiya H: Examination of 7-ethoxycoumarin deethylation and ammonia removal activities in 31 hepatocyte cell lines. *Cell Transplant* 5: 39-40, 1996.
- 6) Gion T, Shimada M, Shirabe K, Nakazawa K, Ijima H, Matsushita T, Funatsu K and Sugimachi K: Evaluation of a hybrid artificial liver using a polyurethane foam packed-bed culture system in dogs. *J Surg Res* 82: 131-136, 1999.
- 7) Ijima H, Matsushita T, Nakazawa K, Fujii Y and Funatsu K: Hepatocyte spheroids in polyurethane forms: functional analysis and application for a hybrid artificial liver. *Tissue Eng* 4: 213-226, 1998.
- 8) Kaneko M, Fukuda J, Ijima H, Nakazawa K, Gion T, Shimada M, Shirabe K, Takenaka K, Sugimachi K and Funatsu K: Development of hybrid artificial liver support system using spheroid culture and application to warm ischemic liver failure in dog and pig as a preclinical test. *Materials Science and Engineering* 6: 245-248, 1998.
- 9) Khalil M, Shariat-Panahi A, Tootle R, McCloskey P, Roberts E, Hodgson H and Selden C: Human hepatocyte cell lines proliferating as cohesive spheroid colonies in alginate markedly upregulate both synthetic and detoxificatory liver function. *J Hepatol* 297: 68-77, 2001.
- 10) Kono Y and Eve AR: Modulation of the expression of liver-specific functions in novel human hepatocytes lines cultured in a collagen gel sandwich configuration. *Biochem Biophys Res Commun* 220: 628-632, 1996.
- 11) Lawson JH and Platt JL: Molecular barriers to xenotransplantation. *Transplantation* 62: 303-310, 1996.
- 12) Mooney D, Hansen L, Vacanti J, Langer R, Farmer S and Ingber D: Switching from differentiation to growth in hepatocytes: control by extracellular matrix. *J Cell Physiol* 151: 497-505, 1992.
- 13) Patience C, Takeuchi Y and Weiss RA: Infection of human cells by an endogenous retrovirus of pigs. *Nature Med* 5: 282-286, 1999.
- 14) Springer AT: Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 346: 425-433, 1990.
- 15) Takagi M, Fukuda N and Yoshida T: Comparison of different hepatocyte cell lines for use in a hybrid artificial liver model. *Cytotechnology* 24: 39-45, 1997.
- 16) Tokiwa T, Miyagiwa M, Kusaka Y, Muraoaka A and Sato J: Effects of various substrate on human hepatoblastoma and hepatoma cell culture. *Cell Biol Int Reports* 12: 131-142, 1988.
- 17) van der Laan LJ, Lockey C, Griffeth BC, Frasier FS, Wilson CA, Onions DE, Hering BJ, Long Z, Otto E, Torbett BE and Salomon DR: Infection by porcine endogenous retrovirus after islet

xenotransplantation in SCID mice. *Nature* 407 : 90-94, 2000.

18) Watanabe FD, Mullan CJ, Hewitt WR, Arkadopoulos N, Kahaku E, Eguchi S, Khalili T, Arnaut W, Shackleton CR, Rozga J, Solomon B and Demetriou AA : Clinical experience with a bioartificial liver in the treatment of severe liver failure :

a phase I clinical study. *Ann Surg* 225 : 484-494, 1997.

19) Wezel AL van : Growth of cell-strains and primary cells on micro-carriers in homogeneous culture. *Nature* 216 : 64-65, 1967.

(受付 2001—5—15)