

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4510425号
(P4510425)

(45) 発行日 平成22年7月21日(2010.7.21)

(24) 登録日 平成22年5月14日(2010.5.14)

(51) Int. Cl. F 1
C 1 2 N 5/071 (2010.01) C 1 2 N 5/00 2 O 2 A
C 1 2 P 21/02 (2006.01) C 1 2 P 21/02 A

請求項の数 4 (全 10 頁)

(21) 出願番号	特願2003-369935 (P2003-369935)	(73) 特許権者	503400019
(22) 出願日	平成15年10月30日(2003.10.30)		永森 静志
(65) 公開番号	特開2005-130758 (P2005-130758A)		東京都港区芝3-4-2-3
(43) 公開日	平成17年5月26日(2005.5.26)	(73) 特許権者	301000505
審査請求日	平成18年9月28日(2006.9.28)		株式会社バイオス医学研究所
前置審査			神奈川県平塚市天沼4-2-8
		(74) 代理人	100087918
			弁理士 久保田 耕平
		(72) 発明者	永森 静志
			東京都港区芝3-4-2-3
		(72) 発明者	細川 正清
			千葉県千葉市稲毛区小中台5-9-1-3
			03
		(72) 発明者	千葉 寛
			千葉県千葉市稲毛区黒砂1-17-8
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 三次元培養による細胞の培養方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

三次元細胞培養担体を収容した三次元細胞培養装置に培養液を供給し、当該担体に肝細胞を担持させ、炭酸ガス気流の存在下において培養液を連続供給することにより当該肝細胞を増殖させ、当該肝細胞からプレグナンX受容体、およびカルボキシラーゼまたはそのアイソザイムからなる群より選択される一種の生体成分を産生させることを特徴とする肝細胞の培養方法。

【請求項2】

前記肝細胞の樹立細胞株がFLCシリーズ株である請求項1に記載の肝細胞の培養方法。

【請求項3】

前記三次元細胞培養担体が、シラン^(TM)またはヒドロキシアパタイトである請求項1に記載の肝細胞の培養方法。

【請求項4】

前記三次元細胞培養装置が、ラジアルフロー型バイオリクターまたは液体培地による培地流動型バイオリクターである請求項1に記載の肝細胞の培養方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ヒト由来細胞、動物細胞および植物細胞の三次元的な立体培養により、生

体内の細胞が有する本来的な生物活性を誘起し、かつ活性化することを可能にする細胞の三次元培養方法に関するものである。

【背景技術】

【0002】

過去40年間、動物細胞の培養技術において、平底フラスコ等を用いた平面培養が一般化しており、生体内の条件を再現した細胞の生体外における培養は行なわれていない。三次元的な立体培養は、いずれの細胞についてもほとんどが行なわれていない状況にあり、かかる平面培養技術による二次元的、人工的な方法で培養された細胞は、本来的に細胞のもつ酵素活性および生合成活性等を発揮し得ないことが報告されるに至っている(Nature 424, 870(2003)等)。

10

【0003】

特に、肝細胞の如き特定の細胞の増殖により得られる医学的研究および治療に有用な生理活性物質を生体内における形態と同一の形態でしかも大量産生せる試みは皆無であり、生体内の生理活性物質の形態に関する知見は得られていない。しかも、肝細胞の三次元培養による生理活性物質の生体外での産生および産生量についても開示されたものがない。

【0004】

かかる状況から、従来、生理活性物質を生体外で培養肝細胞を用いて大量に産生させ得ることについては、報告はなく、特に、生体外における肝細胞の増殖による血清アルブミン、 α -フェトプロテイン、トロンボポエチン、チトクロームP450、プレグナンX受容体、カルボキシラーゼ等の産生系は未だ提案されていない。

20

【非特許文献1】ネイチャー(Nature)424, 870(2003)

【非特許文献2】サイエンス(Science)302, 46(2003)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

従って、本発明の課題は、肝細胞の三次元培養方法を提供することであり、また、本発明の課題は、肝細胞から誘起される血清アルブミン、 α -フェトプロテイン、トロンボポエチン、チトクロームP450、プレグナンX受容体(PXR)、カルボキシラーゼ、肝細胞核因子4(HNF-4)等の生理活性物質を生体外で三次元的に、かつ大量に産生させる肝細胞の培養方法を提供することにある。

30

【課題を解決するための手段】

【0006】

そこで、本発明者らは、前記課題を解決するため鋭意検討を重ねたところ、特定の三次元細胞培養担体を収容した三次元細胞培養装置に肝細胞を含有する培養液を供給し、当該担体に担持させた当該肝細胞に培養液を連続的に供給することにより、肝細胞を増殖させ、生理活性物質の産生が生体内でのそれらと近似した量と質において発現し、平面培養に比較して著しく量産可能なことを見出し、かかる知見に基いて本発明の完成に到達した。

【0007】

かくして、本発明によれば、三次元細胞培養担体を収容した三次元細胞培養装置に培養液を供給し、当該担体に肝細胞を担持させ、次いで、培養液を連続して供給することにより、当該肝細胞を増殖させ、当該肝細胞から生理活性物質を産生させることを特徴とする肝細胞の培養方法が提供される。

40

【0008】

また、本発明によれば、三次元細胞培養担体を収容した三次元細胞培養装置に培養液を供給し、当該担体に肝細胞を担持させ、次いで培養液を連続して供給することにより当該肝細胞を増殖させ、当該肝細胞から産生させてなる生理活性物質が提供される。

50

【発明の効果】

【0009】

本発明によれば、本来的にヒト由来細胞、動物細胞、植物細胞、特に肝細胞のもつ生理活性の誘起や生理活性物質の産生が、生体内でのそれらと同様であり、または近い量と質において発現されることとなり、動物実験が不必要となる場合もある。さらに、これら細胞の正確、かつ資質的な性状を明確に把握できる。このことにより、今日までの平面培養による蓄積された細胞に関する知見を修正せざるを得ない状況にある。

【0010】

チトクローム；CYP3A4は肝臓における薬剤代謝の約50%に参与しているといわれ、本発明の方法に係るRFB（ラジアル・フロー・バイオリアクター（以下本明細書において同じ。））培養による肝細胞カルシノーマであるFLC-4またはFLC-5の立体培養によって、この活性が100倍以上に増大することが明らかとなった。本発明により、肝機能の重要な働きである薬剤の代謝機構が、生体中の肝機能と同様の活性を持つことにより、本細胞培養により直接的に薬物動態のモデルとなることが可能となった。また肝臓の本来的な生産成分である血清アルブミンの生産量も、本発明により生体におけるアルブミン生産量に近い値が得られている。これは、肝機能が本来的な能力を発揮しうる培養条件であることを示している。肝機能のもう一つの重要な活性であるアンモニアの代謝活性もきわめて高く、RFB培養開始4日に塩化アンモニア5mMの負荷により、さらに4日後よりアンモニア濃度の低下と尿素濃度の上昇がみとめられる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0011】

本発明は、三次元細胞培養担体を収容した三次元細胞培養装置に培養液を供給し、当該担体に肝細胞を担持させ、培養液の供給を継続しながら当該肝細胞を増殖させ、生理活性物質を産生させる肝細胞の三次元培養方法に関するものであるが、さらに好ましい実施態様として、次の1)～3)に掲げるものを包含する。

【0012】

- 1) 前記三次元細胞培養担体が、シラン^(TM)またはヒドロキシアパタイトである肝細胞の培養方法。
- 2) 前記三次元細胞培養装置が、前記三次元細胞培養担体が収容されたラジアルフロー型バイオリアクターである肝細胞の培養方法。
- 3) 前記細胞が肝細胞ばかりでなく、隣細胞等、増殖性を持ち、従来の平面培養では生物活性を発現できない細胞の培養方法。

【0013】

本発明に係る肝細胞の培養方法において用いられる肝細胞は、ヒトの肝臓から採取したものを平板培養法等による培養により増殖したものでよく、肝細胞の樹立細胞株が好ましい。特に好ましい細胞株として本発明者が提案したFLC-1、FLC-2、FLC-3、FLC-4(FERM BP-5165)、FLC-5、FLC-6、FLC-7、HePG₂(ATCCにより入手可)等を挙げることができる。肝細胞は、三次元細胞培養装置へ供給後、肝細胞の培養条件、5～6%炭酸ガス気流中、35～38℃、好ましくは、36～37℃で通常7～14日間培養すると、肝細胞が十分に増殖して前記生理活性物質の産生を開始するに至る。

【0014】

本発明に係る肝細胞の三次元培養方法によれば、ヒト由来の肝細胞FLC-4を用いることにより肝臓細胞の本来的な生産成分である血清アルブミン、 α -フェトプロテイン、トロンボポエチン等生理活性物質を平面培養に比較して約10倍産生させる培養方法を提供することができる。これは、生体内におけるアルブミン産生量に近似したものである。

従って、本発明に係る生体外における培養条件は、肝機能が本来的な能力を発揮できる条件に該当しているものといえる。

【0015】

また、本発明に係る肝細胞の三次元培養方法によれば、ヒト由来の肝細胞FLC-5を

用いることにより、薬物代謝に重要なチトクローム P 4 5 0 (以下「CYP」という。) 1 A 2、2 A 6、2 B 6、2 C 9、2 D 6、2 E 1 および 3 A 4 を平面培養に比較して数 1 0 0 倍産生させる培養方法を提供する。

同様に、本発明によれば、ヒト由来の肝細胞 FLC - 5 を用いることにより、副腎ホルモン系のプレグナン X 受容体 (PXR) を平面培養に比較して約 2 2 倍産生させることが可能な肝細胞の三次元培養方法を提供する。

また、FLC - 5 細胞を用いることにより、肝細胞核因子 4 (HNF - 4) を平面培養に比較して約 1 . 7 倍産生可能な肝細胞の培養方法を提供する。

さらに、本発明によれば、FLC 細胞によれば、肝特異性酵素、カルボキシラーゼおよびそのアイソザイムを平面培養に比較して約 2 0 0 倍産生させる肝細胞の培養方法を提供する。

10

また、本発明によれば、肝細胞における薬物代謝に係るトランスポーター、酵素の産生を平面培養に比較して数 1 0 倍以上で行なう肝細胞の三次元培養方法を提供する。

【0016】

本発明の肝細胞の培養方法において用いられる培養液は、肝細胞を増殖させることができるものであれば、如何なる組成のものでもよく、無機質、糖、アミノ酸、ペプチド、ビタミン、有機酸、核酸、pH調整剤、酵素等の細胞の培養に必要な成分を含有するものであればよい。

【0017】

例えば、無機質としては、NaCl、KCl、MgCl₂、MgSO₄、NaH₂PO₄、FeSO₄・7H₂O、ZnSO₄・7H₂O、CuSO₄・5H₂Oなどが挙げられ、アミノ酸、ペプチドとしては、L-アスパラギン塩酸塩、L-アラニン、アラニル-L-グルタミン、L-アスパラギン酸、L-グルタメート、グリシン、グリシル-L-グルタミン、L-イソロイシン、L-リジン、L-フェニルアラニン、L-セリン、L-オルニチン、L-スレオニン、L-トリプトファン、L-チロシン、L-バリン、インシュリンなどが挙げられ、糖としては、糖や糖アルコール、配糖体などが挙げられ、例えばD-グルコース、D-マンノース、D-ガラクトース、イノシトールなどが挙げられる。有機酸としては、遊離の酸又はエステルなどの有機酸誘導体が挙げられ、例えばコハク酸、コリン二酒石酸(choline bitartrate)、葉酸、ピルビン酸ナトリウム、グリセロリン酸などが挙げられる。ビタミン類としては、塩酸ピリドキサル、リボフラビンなどが挙げられる。核酸としては、ウリジンなどが挙げられる。pH調整剤としては、NaOH、炭酸ガス、NaHCO₃などが挙げられる。

20

30

【0018】

培養液としては、市販の培養液を用いることもできる。市販の培養液の組成を例示すると次の如きものである(mg/L)。

【表 1】

NaCl	6000	KCl	400
MgCl ₂	100	MgSO ₄	98
NaH ₂ PO ₄	125	FeSO ₄ ・7H ₂ O	0.8
ZnSO ₄ ・7H ₂ O	0.01	CuSO ₄ ・5H ₂ O	0.001
D-グルコース	2000	D-マンノース	500
L-アスパラギン塩酸塩	200	D-ガラクトース	200
L-アラニン	20	アラニル-L-グルタミン	500
L-アスパラギン酸	20	L-グルタメート	20
グリシン	30	グリシル-L-グルタミン	500
L-イソロイシン	105	L-リジン	146
L-フェニルアラニン	67	L-セリン	80
L-オルニチン	100	L-スレオニン	95
L-トリプトファン	25	L-チロシン	64
L-バリン	94	コハク酸	106
ウリジン	5	コリンニ酒石酸	20
葉酸	4	イノシトール	20
塩酸ピリドキサル	4	リボフラビン	0.4
ピルビン酸ナトリウム	110	グリセロリン酸	1500
HEPES	1200	NaHCO ₃	1800
ヒトトランスフェリン	5	インシュリン	5
フェノールレッド	5		

10

20

【0019】

次に、細胞の培養方法に用いられるバイオリアクターについて説明する。

本発明に係る細胞の培養方法に用いられるバイオリアクターとしては、ラジアルフロー型バイオリアクターおよび培地流動型バイオリアクターを挙げることができる。

前記ラジアルフロー型バイオリアクターは、細胞が固定化された担体を培養槽内に充填した固定層型のものであれば、特に限定されるものではなく、従来、提案されている各種形式のものを使用することができる。例えば、一例を挙げると、図5に示すラジアルフロー型バイオリアクター1は、円筒形の本体2内にIKVAV C₆₀ フラーレンを含有する粒状の三次元細胞培養担体3が充填されたものである。

30

【0020】

この形式のバイオリアクターでは、タンク下端から上方へ培養液が供給され、上方出口から排出され、培養液は培養液貯蔵容器（図示なし。）に蓄えられる。

また、ラジアルフロー型バイオリアクターは、複数の酸素補強用パイプ、複数の培養液回収パイプが設けられ、担体の充填位置との関連で栄養分濃度、溶存酸素濃度がリアクター内に均一に分布するように配置される。

さらに、他の形態のラジアルフロー型バイオリアクターとして、W001/014517号再公表公報の第1図に記載されている三次元的細胞培養担体が充填されたラジアルフロー型バイオリアクターを用いることができる。

40

【0021】

[実施例]

次に、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。もっとも本発明は、下記実施例により限定されるものではない。

なお、細胞は、次の方法で培養し、細胞培養装置、細胞培養担体、分析製造等は以下のものを用いた。

【0022】

(1) 細胞培養方法

培養液調整槽に培養液を装入し、これに酸素、二酸化炭素および苛性アルカリ等を添加し、酸素濃度、二酸化炭素濃度およびpHを所定の範囲に調整し、培養装置（ラジアルフ

50

ロー型バイオリアクター)に供給した後、別途、培養した肝細胞を培養後に添加し、当該バイオリアクターに供給し、バイオリアクター内の細胞培養担体に担持させた。

次いで、培養担体上の細胞に培養液を供給し、前記培養条件を制御しながら、循環させ、細胞を増殖させ、担体上および培養液上清中の生理活性物質の産生量を測定した。

(2) 細胞培養装置

ラジアルフロー型バイオリアクター(以下、「FRB装置」という。)(エイブル社製「RA-15」)および附属装置を使用した。

(3) 細胞培養担体

ヒドロキシアパタイト;ペンタックス社製「セルヤード200」

(4) 分析装置等

・PCR装置および試薬キット;パーキンエルマー アプライド バイオシステムズ(PerkinElmer Applied Biosystems)社製「7700型およびMMRキット」

・液体クロマトグラフィー装置等;「シマツLC'10A」

【実施例1】

【0023】

ヒト由来の肝がん細胞FLC-4を用い、培養液として無血清(味の素(株)製「AFS104」)を用いた。5%炭酸ガス気流中37℃で4日間培養した。

培養後、培地上清液中のアルブミン量を液体クロマトグラフィーで定量した。

本発明に係るRFB培養によれば、図1に示すように平面培養に比較して約7倍の産生量を得た。

【実施例2】

【0024】

ヒト由来の肝がん細胞FLC-5を前記培養方法により培養液として無血清AFS104(味の素社製)を用い、5%炭酸ガス気流中37℃で4日間培養した。培養後、培養液上清中および培養担体から分離したCYP3A4の産生量についてmRNAをマーカーとして定量し、平面培養における産生量と比較したところ、図2に示すように本発明方法による培養方法は、108倍高い産生量を示した。

培養した細胞は、0.02%のEDTAを添加したトリプシン(25USP単位/ml、DIFCO製)で処理した。マイクロソーム分画は、1000rpm-5分、1000rpm-10分の遠心処理の後、10000rpm-60分のペレット分画を使用した。CYPの誘発剤としてリファンピシンを添加した。また、GAPDHのRNA量を用いてmRNA値の補正を行なった。

【実施例3】

【0025】

ヒト由来の肝がん細胞FLC-5を前記細胞培養方法により、培養液として無血清AFS104(味の素社製)を用い、5%炭酸ガス気流中37℃で4日間培養した。培養後、培養液上清中に産生した副腎ホルモンのプレグナンX受容体(PXR)の含有量についてmRNAをマーカーとして実施例2の条件と同一の条件でRT-PCR法により定量した。

PXRは、リファンピシンの誘導により平面培養による産生量と比較したところ、図3に示すように約22倍であった。

【実施例4】

【0026】

ヒト由来の肝がん細胞FLC-5を前記細胞培養方法により、培養液として無血清AFS104(味の素社製)を用い、5%炭酸ガス気流中37℃で4日間培養した。培養後、培養液上清中に含有する肝細胞核因子4(HNF-4)についてmRNAをマーカーとしてRT-PCR法により定量した。定量条件は、実施例2の条件と同一とした。

肝細胞核因子の産生量は、図4に示すようにリファンピシンの誘導により平面培養に比較して約1.7倍であった。

【産業上の利用可能性】

10

20

30

40

50

【0027】

本発明は、肝細胞の三次元培養方法であって、生理活性物質を生体内における形態・量と同一の形態・量による産生を実現する肝細胞の三次元培養方法を提供するものである。

本発明によれば、従来の二次的・平面的培養では得られなかった形態・量の生理活性物質を得ることができ、動物実験が不必要となる機会を与え、さらに、細胞の正確かつ資質的な性状の明確な評価手段を提供する。

従って、本発明は、今日までの平面培養による蓄積された細胞の知見を根底からくつがえす機会を提供するものであり、新規理論に基づく生化学の確立と新規産業の創成に寄与するところ極めて大きいものである。

【図面の簡単な説明】

10

【0028】

【図1】本発明に係る肝細胞FLC-4の培養方法(RFB)と従来法の平面培養によるアルブミン産生量の比較図である。

【図2】本発明に係る肝細胞FLC-5の培養方法(RFB)と従来法の平面培養によるCYP3A4の比較図である。

【図3】本発明に係る肝細胞FLC-5の培養方法(RFB)と従来法の平面培養によるPXRの比較図である。

【図4】本発明に係る肝細胞FLC-5の培養方法(RFB)と従来法の平面培養によるHNF-4αの量の比較図である。

【図5】ラジアルフロー型バイオリアクターを例示した解説図である。

20

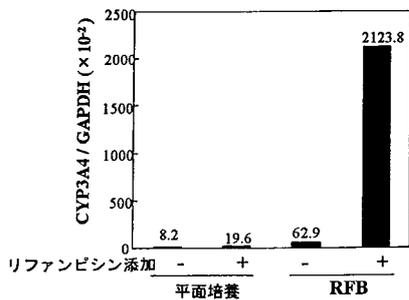
【符号の説明】

【0029】

- 1 ラジアルフロー型バイオリアクター
- 2 バイオリアクター本体
- 3 細胞培養担体

【図2】

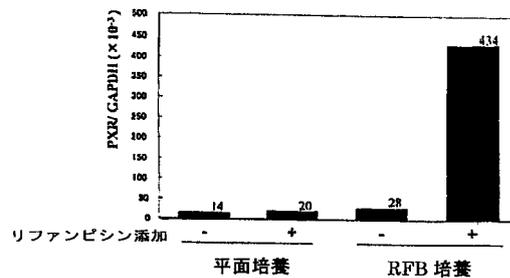
RFB培養と平面培養におけるCYP3A4の生産量の比較



注) RNA量を補正するためGAPDHを用いた。

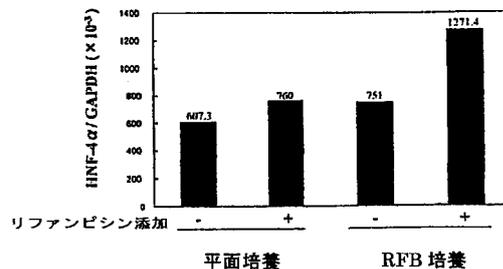
【図3】

RFB培養と平面培養におけるFLC5細胞のPXRαの生産量の比較



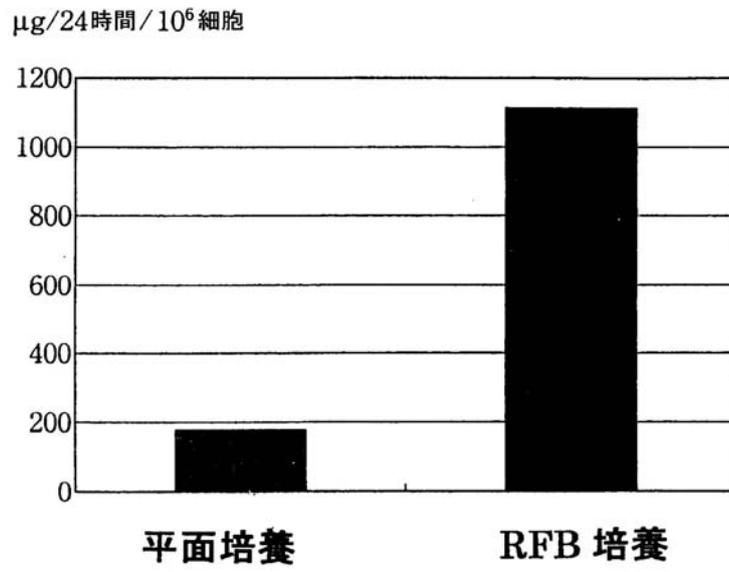
【図4】

RFB培養と平面培養におけるHNF-4αの生産量の比較

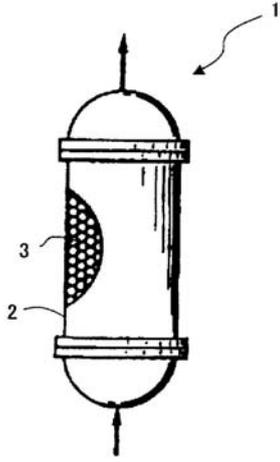


【図1】

FLC-4 細胞のアルブミン生産量と培養法の比較



【図5】



フロントページの続き

審査官 太田 雄三

- (56)参考文献 特開2003-093052(JP,A)
国際公開第03/011353(WO,A1)
特開2003-235541(JP,A)
国際公開第03/072155(WO,A1)
第123年会日本薬学会講演要旨集4,2003年 3月 5日,p.44,28【P2】I-500
Bio Clinica,2003年 3月10日,Vol.18, No.3,pp.49-55
細胞,2002年11月30日,第34巻、13号,pp.31-34
創薬等ヒューマンサイエンス研究重点研究報告書,2002年 9月10日,第7分野,pp.18-37
日本セラミックス協会 2001年年会講演予稿集,2001年 3月21日,p.278,2 H29

(58)調査した分野(Int.Cl.,DB名)

C12N 5/071
C12P 21/02
CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)
PubMed
Cinii
G-Search