

令和元年度中小企業経営支援等対策費補助金
(戦略的基盤技術高度化支援事業)

「脂質代謝研究素材として高脂質代謝
機能と高利便性を備えるヒト肝細胞の開発」

成 果 報 告 書

令 和 2 年 5 月

公益財団法人ひろしま産業振興機構

目 次

第1章	研究開発の概要	
1-1	研究開発の背景・研究目的及び目標	p.
1-2	研究開発の実施体制	p.
1-3	研究開発推進委員会	p.
1-4	研究開発項目	p.
1-5	成果概要	p.
1-6	当該研究開発の連絡窓口	p.
第2章	本 論	
2-1	PXB-cells LA の基本的生産方法及び取り扱い方法の確立	
2-1-1	PXB マウスからのPXB-cells LA の取り出し方法の確立	
①	細胞取り出し時期（週齢）の設定	p.
②	細胞調整温度の設定	p.
③	灌流液組成（細胞保護剤の添加）の設定	p.
2-1-2	PXB-cells LA の取り扱い方法の確立	
④	細胞播種濃度の設定	p.
⑤	輸送期間の設定	p.
⑥	維持培養期間の設定及び従来素材との比較	p.
⑦	輸送・培養培地及び解析用培地の設定	p.
2-1-3	中活	p.
2-2	PXB-cells LA の脂質代謝機能確認・調整	
2-2-1	PXB-cells LA の脂質合成遺伝子・タンパク発現量の測定	
⑧	遺伝子発現比較（リアルタイムPCR法）	p.
⑨	タンパク質発現比較（ELISA法）	p.
⑩	タンパク質発現比較（ウエスタンブロット法）	p.
⑪	遺伝子発現比較（マイクロアレイ法）	p.
2-2-2	PXB-cells LA の化学物質による脂質合成・分解機能に対する影響	
⑫	予備試験（用量設定試験）	p.
⑬	本試験	p.
2-2-3	中活	p.
2-3	PXB-cells LA のヒト組織類似性の確認	
2-3-1	PXB-cells LA とヒト組織由来サンプルの脂質機能の比較	

	⑭	ヒト血清との比較	p.
	⑮	ヒト非凍結肝細胞との比較	p.
2-3-2		中活	p.
2-4		販売促進準備	
2-4-1		对外発信	
	⑯	学術会議での発表	p.
	⑰	学術論文での発表	p.
	⑱	販促準備	p.
2-4-2		中活	p.
最終章		結論	
3-1		研究開発成果の総括	p.
3-2		補助事業終了後の技術課題	p.
3-3		事業展開について	p.
3-4		その他補助事業の成果に係る発表、報道など	p.

第1章 研究開発の概要

1-1

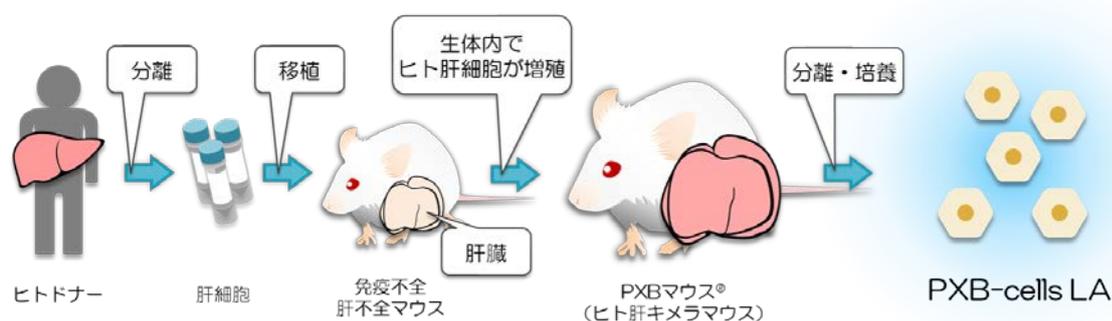
<研究開発の背景>

高齢化が進む現代社会において、「生活習慣病」は健康長寿の最大の阻害要因となるだけでなく、国民医療費にも大きな影響を与えている。生活習慣病の多くは内臓脂肪型肥満が原因であるため、その予防と治療を目的として、「脂質」を標的とする機能性食品や創薬などの研究開発が行われているが、その現場では、「高い脂質代謝機能」と「高い利便性」を備えた研究素材が求められている。

<研究開発の目的>

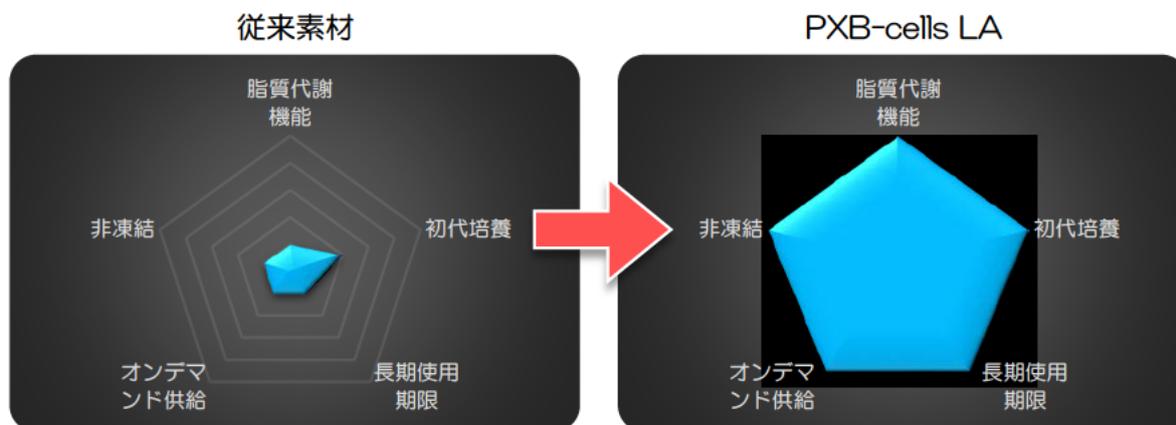
従来素材であるヒト生体由来肝細胞やヒト肝臓癌細胞は、「高い脂質代謝機能」を反映する品質である、「高脂質代謝機能」、「初代培養＝動物から取り出した細胞を初めて細胞実験に使用すること」、「長期使用期限」を備えていない。また、「高い利便性」を反映する品質である、「オンデマンド供給＝利用時期に応じて研究素材を提供すること」、「非凍結＝利用開始まで細胞を凍結させないこと」も備えていない。

弊社株式会社フェニックスバイオ（PhoenixBio）は、ヒト肝細胞を有するマウス「PXBマウス®＝自社商品名」の量産化に世界で初めて成功し、同マウスの体内で生きているヒト肝細胞を、新鮮で品質の良い研究素材として常時供給できるプラットフォームを得た。更に最近の研究により、この「PXBマウスの体内から取り出したヒト肝細胞」が、脂質研究用の素材に求められる「高い脂質代謝機能」と「高い利便性」を満たす可能性が見出された。本研究開発では、PXBマウスから取り出した新鮮なヒト肝細胞を利用し、ヒト肝臓の脂質代謝（脂質が様々に変化しながら入れ替わること）の研究領域に求められている、「高い脂質代謝機能」と「高い利便性」を備える新しい研究用ヒト肝細胞 [PXB-cells LA（仮称）＝自社商品名] を開発する。



<研究目標>

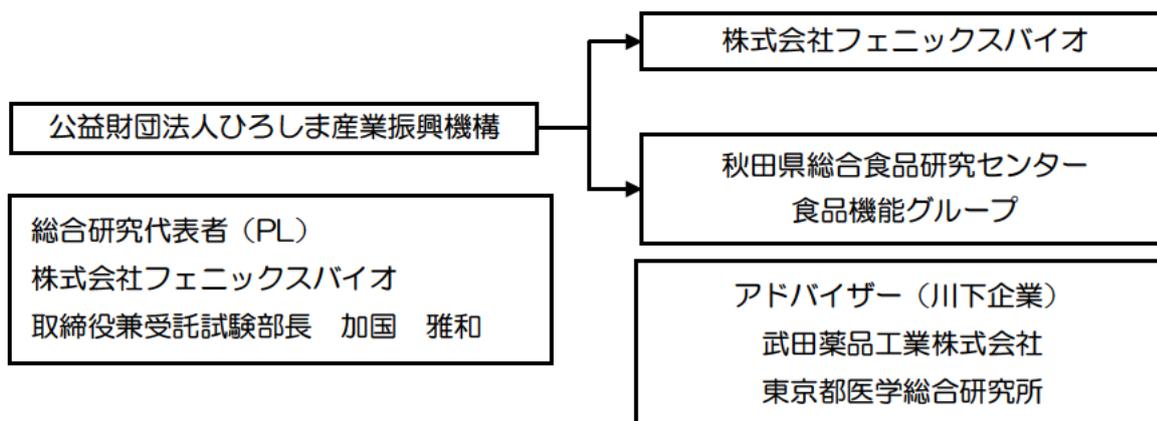
PXB-cells LA が、脂質研究用の素材に求められる「高い脂質代謝機能」と「高い利便性」を満たすよう、①「高脂質代謝機能」、②「初代培養」、③「長期使用期限」、④「オンデマンド供給」、⑤「非凍結」の5つの品質の達成を目標とした。



1-2 研究開発の実施体制

研究組織（全体）

[事業管理機関：補助事業者]



[株式会社フェニックスバイオ]

氏名	所属・役職
加国 雅和	取締役 受託試験部長
高橋 真生	受託試験部

[秋田県総合食品研究センター]

氏名	所属・役職
畠 恵司	食品機能グループ 上席研究員
戸松 さやか	食品機能グループ 主任研究員
佐々木 玲	食品機能グループ 主任研究員
梅川 結	食品機能グループ 研究員

1-3 研究開発推進委員会

研究開発推進委員会はプロジェクトの進捗確認だけでなく、研究開発した技術の性能や有用性、商品として体現させた際の事業性、また産業社会への貢献性を確認するとともに、川下ユーザーを中心とし、様々な観点からアドバイスを受けることで、その後の研究開発にフィードバックさせることを目的とした。

[研究開発推進委員会委員一覧]

氏名	所属・役職	備考
加国 雅和	株式会社フェニックスバイオ 取締役 受託試験部長	☑ PL
高橋 真生	株式会社フェニックスバイオ 受託試験部	☑
畠 恵司	秋田県総合食品研究センター 食品機能グループ 上席研究員	☑
小原 道法	公益財団法人東京都医学総合研究所 ゲノム医科学研究分野 特任研究員	アドバイザー
平林 英樹	武田薬品工業株式会社 薬物動態研究所	アドバイザー

1-4 研究開発項目

番号	研究開発項目	完成期日
1-1	PXB マウスからのPXB-cells LA の取り出し方法の確立	
	①細胞取り出し時期（週齢）の設定	初年度
	②細胞調整温度の設定	初年度
	③灌流液組成（細胞保護剤の添加）の設定	初年度
1-2	PXB-cells LA の取り扱い方法の確立	
	④細胞播種濃度の設定	初年度
	⑤輸送期間の設定	初年度
	⑥維持培養期間の設定及び従来素材との比較	初年度
	⑦輸送・培養培地及び解析用培地の設定	初年度
2-1	PXB-cells LA の脂質代謝機能の確認	
	⑧遺伝子発現比較（リアルタイムPCR法）	初年度
	⑨タンパク質発現比較（ELISA法）	最終年度
	⑩タンパク質発現比較（ウエスタンブロット法）	初年度
	⑪遺伝子発現比較（マイクロアレイ法）	初年度
2-2	PXB-cells LA の脂質合成・分解機能の確認	
	⑫予備試験	最終年度
	⑬本試験	最終年度
2-3	ヒト由来素材との比較	
	⑭ヒト血清との比較	最終年度
	⑮ヒト新鮮肝細胞との比較	最終年度
2-4	販売促進準備・知財関連	
	⑯学術会議での発表	最終年度

⑰	⑰ 学術論文での発表	最終年度
⑱	⑱ 販促準備	最終年度

1-5 成果概要

1-1. PXB マウスからの PXB-cells LA の取り出し方法の確立

PXB マウスから PXB-cells LA を回収するための週齢（17 週齢～）、細胞調整温度（氷冷～室温）、灌流液について最適条件を確立した。

1-2. PXB-cells LA の脂質代謝機能の確認

PXB-cells LA の脂質代謝能を最大限に引き出すための播種密度、培養期間、及び培地条件を確立した。また細胞輸送についても、海外顧客を想定した長期間輸送において、脂質代謝能に影響が無いことを確認した。

次に PXB-cells LA と従来素材（ヒト肝臓癌株化細胞）を比較し、PXB-cells LA が生体肝組織に極めて類似した脂質代謝能を高度に維持する事を確認した。

2-1. PXB-cells LA の脂質代謝機能の確認

1-2 において確認された PXB-cells LA の高度な脂質代謝能が、どのようなメカニズムで機能しているのかを遺伝子・タンパク発現から解析した。その結果、従来素材と比較して、脂肪酸及びアポリポタンパク合成能が極めて高いことを確認した。

2-2. PXB-cells LA の脂質合成・分解機能の確認

脂質代謝について薬効が報告されている医薬品や食品由来成分を用いて、PXB-cells LA の化学物質に対する反応性を評価した。その結果、多くの化学物質について、過去の報告と同様の反応を示す事を確認した。

2-3. ヒト由来素材との比較

PXB-cells LA がヒト由来素材と比較してどの程度の類似性があるのかを評価した。その結果、ヒト血清及びヒト非凍結肝細胞と全く同じリポタンパク質プロファイルを有することを確認した。

2-4. 販売促進準備・知財関連

研究開発成果について、学術会議及び学術論文で発表した。また製品の取扱説明書やパンフレット等の製作の準備を進めた。

1-6 当該研究開発の連絡窓口

加国 雅和 総括研究代表者 (PL)

株式会社フェニックスバイオ

TEL : 082-431-0016 FAX : 082-431-0017

E-mail : masakazu.kakuni@phoenixbio.co.jp

第2章 本論

2-1 PXB-cells LA の基本的生産方法及び取り扱い方法の確立

2-1-1 PXB マウスからの PXB-cells LA の取り出し方法の確立

①細胞取り出し時期（週齢）の設定（初年度）

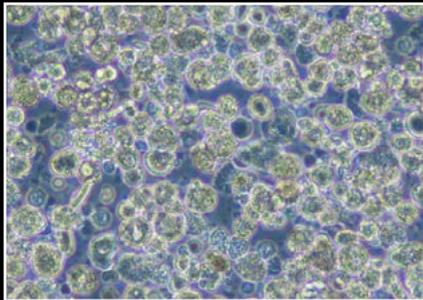
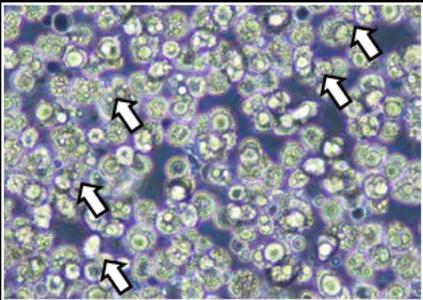
PXB-cells LA は肝不全免疫抑制マウスにヒト肝細胞を移植した後、14 週以上(17 週齢～) マウス肝臓内で増殖させたマウスから分離された肝細胞である。そこで、若週齢（8 週齢：8w）又は高週齢（22 週齢：22w）の個体を使用し、分離した PXB-cells LA の脂質代謝能がどのように変化するかを検証した。

その結果、8wは22wと比較して回収細胞量及び生存率が低下し、播種直後の細胞形態の観察像において、8wは細胞内に脂肪滴が確認されなかった（Table 1）。8wの細胞収量の低下は、8wの PXB マウスがヒト肝細胞の増殖途上であるためと考えられた。

また、両群の細胞外（培養上清中）脂質量はほぼ等量を示し、細胞内脂質量（トリグリセリド）が低下した（Fig 1）。

22wの結果は以降の試験結果に示す 17 週齢から得られた細胞と同様であったため、PXB cells LA の脂質代謝能は 17 週齢ですでに安定しているものと考えられた。PXB Cells LA として取り出す PXB マウス週齢は 17 週齢以上のものが適することを確認した。

Table 1. ①の回収細胞量，生存率，細胞画像

	8w	22w
回収細胞数 (× 10 ⁸ cells)	0.46	2.37
回収細胞生存率 (%)	83.64	91.86
播種直後の細胞画像 (矢印は脂肪滴を示す)		

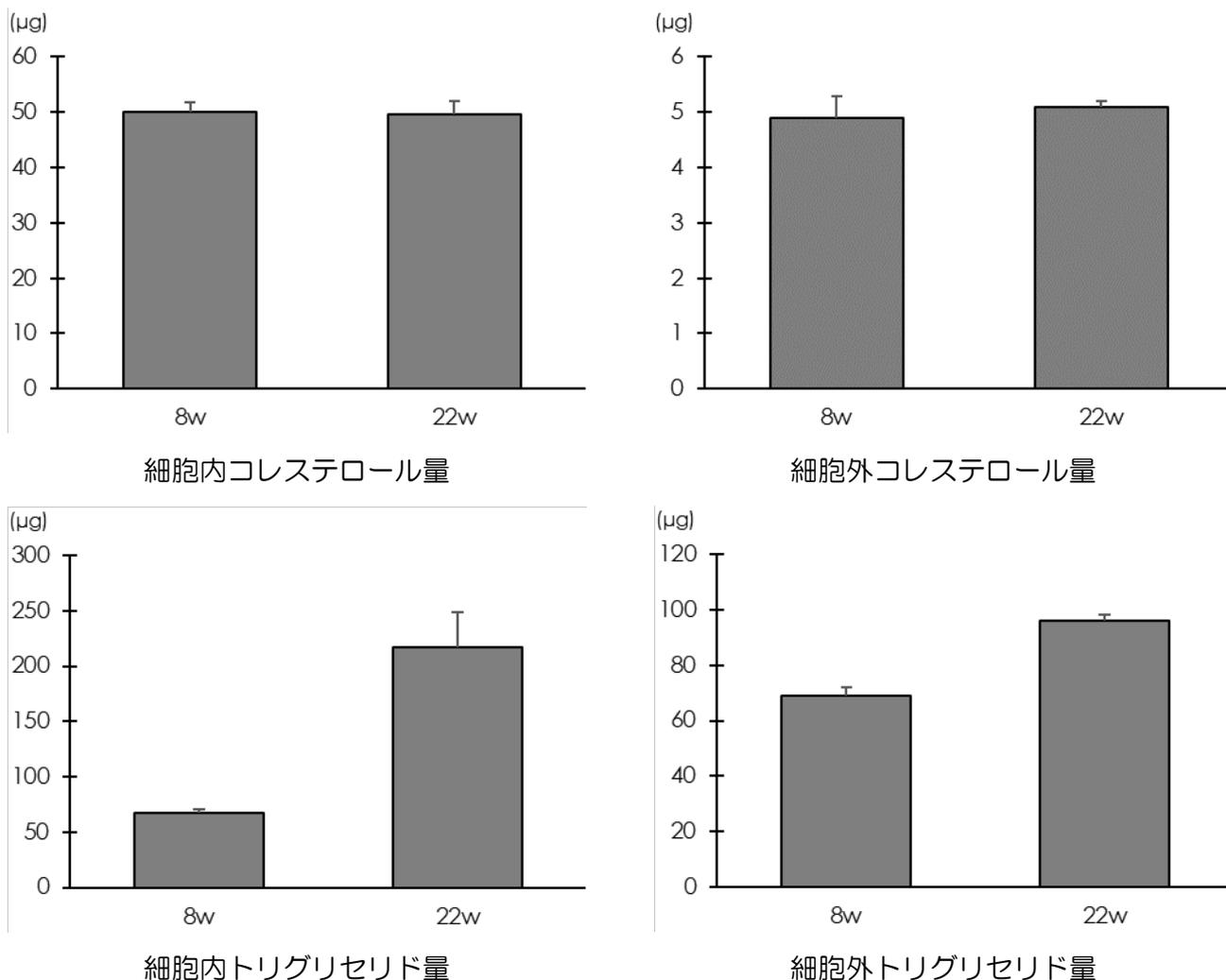


Fig 1. ①の細胞外/細胞内脂質量比較

②細胞調整温度の設定（初年度）

一般的に細胞の取り扱いでは冷温から室温が適切と考えられているが、温度がPXB-cells LAの脂質代謝機能に与える影響は厳密には未確認であった。そこで、PXB-cells LAの播種直前に行われる細胞調整作業の温度条件を通常（4° C：CC）、室温（約23° C：RC）、及び恒温（37° C：TC）に設定し、播種後の細胞状態及び脂質代謝能に及ぼす影響を検証した。その結果、TCにおける生存率が低下し（Table 2）、播種後1日の細胞形態の観察像から、単層細胞上に細胞塊デブリが多数付着した像が観察され（Fig 2：矢印）、培養終了時まで同状態が継続して観察された。

また、各群間の細胞内脂質量、培養上清中脂質量、及びリポタンパクプロフィールに変化は認められなかった（Fig 3）。このことから、細胞調整時の温度条件の変化は脂質代謝能に影響を与えないことを確認した。回収細胞生存率の結果を受け、細胞調整時の作業温度は通常条件（4° C）～室温（約23° C）の範囲が適することを確認した。

Table 2. ②の回収細胞量, 生存率

	CC	RC	TC
回収細胞生存率 (%)	92.42	92.73	86.89
Cell number ($\times 10^6$ cells)	0.31 ± 0.03	0.35 ± 0.02	0.31 ± 0.03

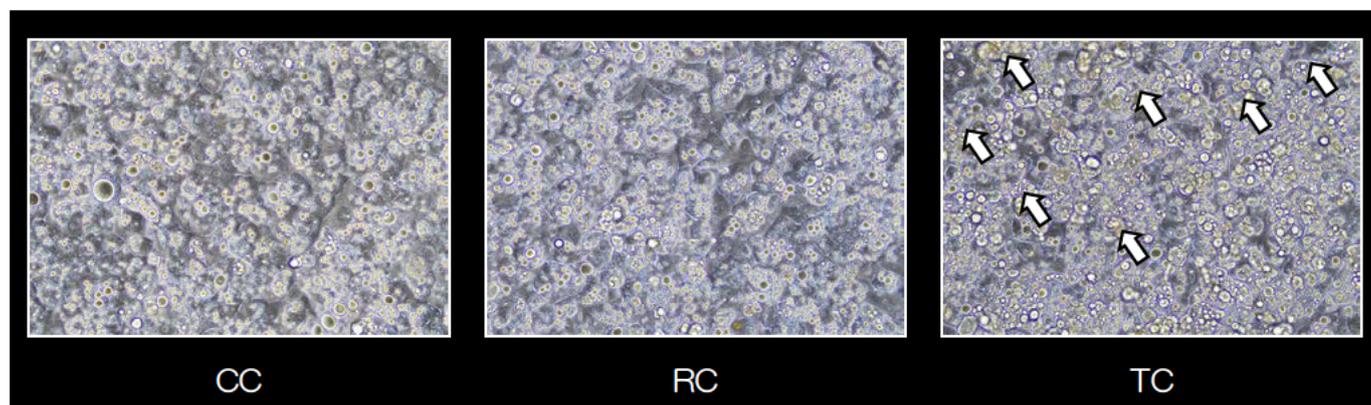
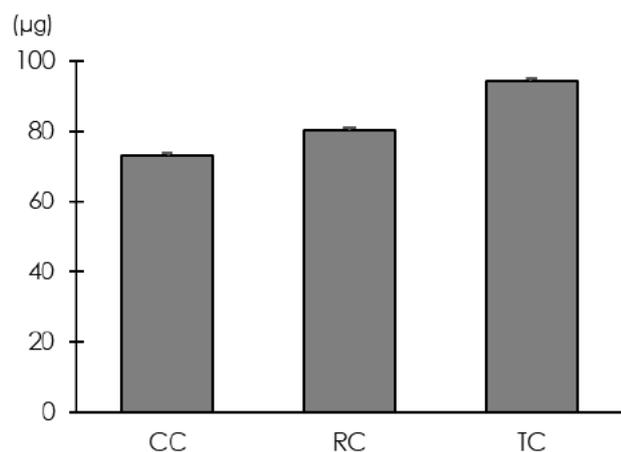
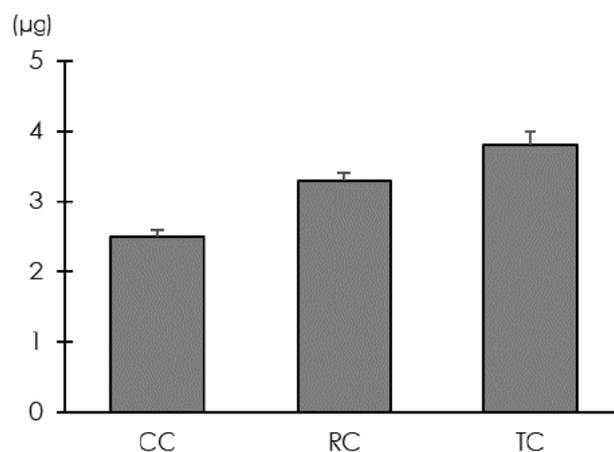


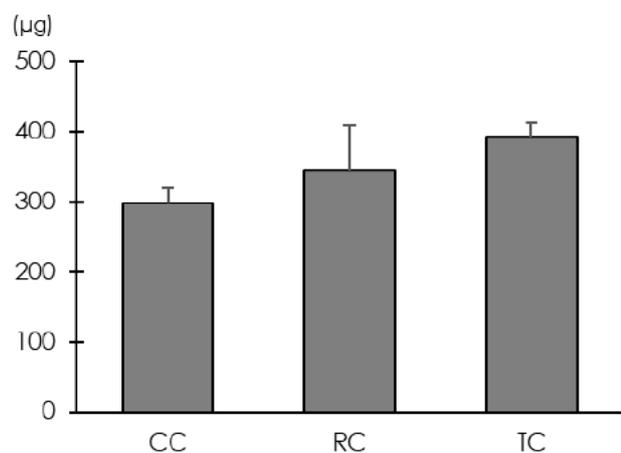
Fig 2. ②の播種後1日の細胞画像



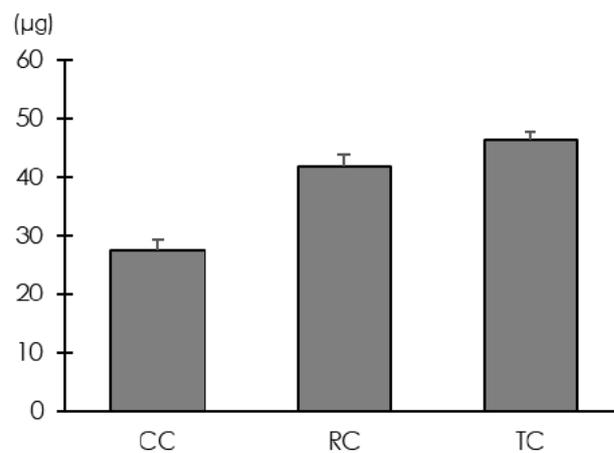
細胞内コレステロール量



細胞外コレステロール量



細胞内トリグリセリド量



細胞外トリグリセリド量

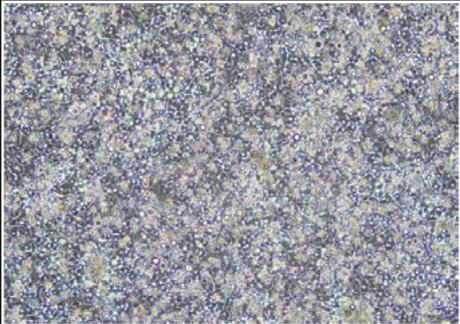
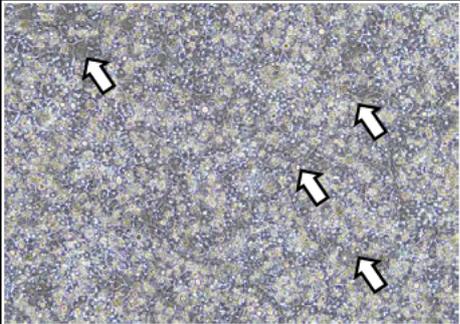
Fig 3. ②の細胞外/細胞内脂質量比較

③灌流液組成（細胞保護剤の添加）の設定（初年度）

PXB-cells LA は、肝臓組織の結合組織を灌流液中の酵素により消化された後、物理刺激により遊離・回収されるために、分離時に多大なストレスを受けていると考えられる。そこで、医薬品として肝臓の抗炎症、肝機能改善の用途として使用されているグリチルリチン酸（強カネオミノファーゲンシー：ミノファーゲン製薬）を細胞保護剤として灌流液に添加することで、播種後の細胞状態及び脂質代謝能に及ぼす影響を検証した。

その結果、未処理群（CP）及びグリチルリチン酸処理群（GP）の生存率はほぼ同等の値を示し、播種時の細胞形態に変化は認められなかったが、播種後 6 日目において、GP 培養上清中に剥離した浮遊細胞の増加が確認され、細胞剥離に伴う細胞間隙の拡大が観察された（Table 3）。また、細胞内脂質量、培養上清中脂質量、及びリポタンパク質プロファイルには変化は認められなかった（Fig 4）。したがって、同試薬を添加した灌流液による細胞分離はその後の脂質代謝能に影響を与えないことを確認した。灌流液へのグリチルリチン酸の添加は、適当でないことが確認された。

Table 3. ③の回収細胞量，生存率，細胞画像

	CP	GP
回収細胞生存率 (%)	88.10	89.67
Cell number ($\times 10^6$ cells)	0.29 ± 0.05	0.27 ± 0.01
維持培養 6 日の細胞形態 (矢印は細胞間隙の拡大を示す)		

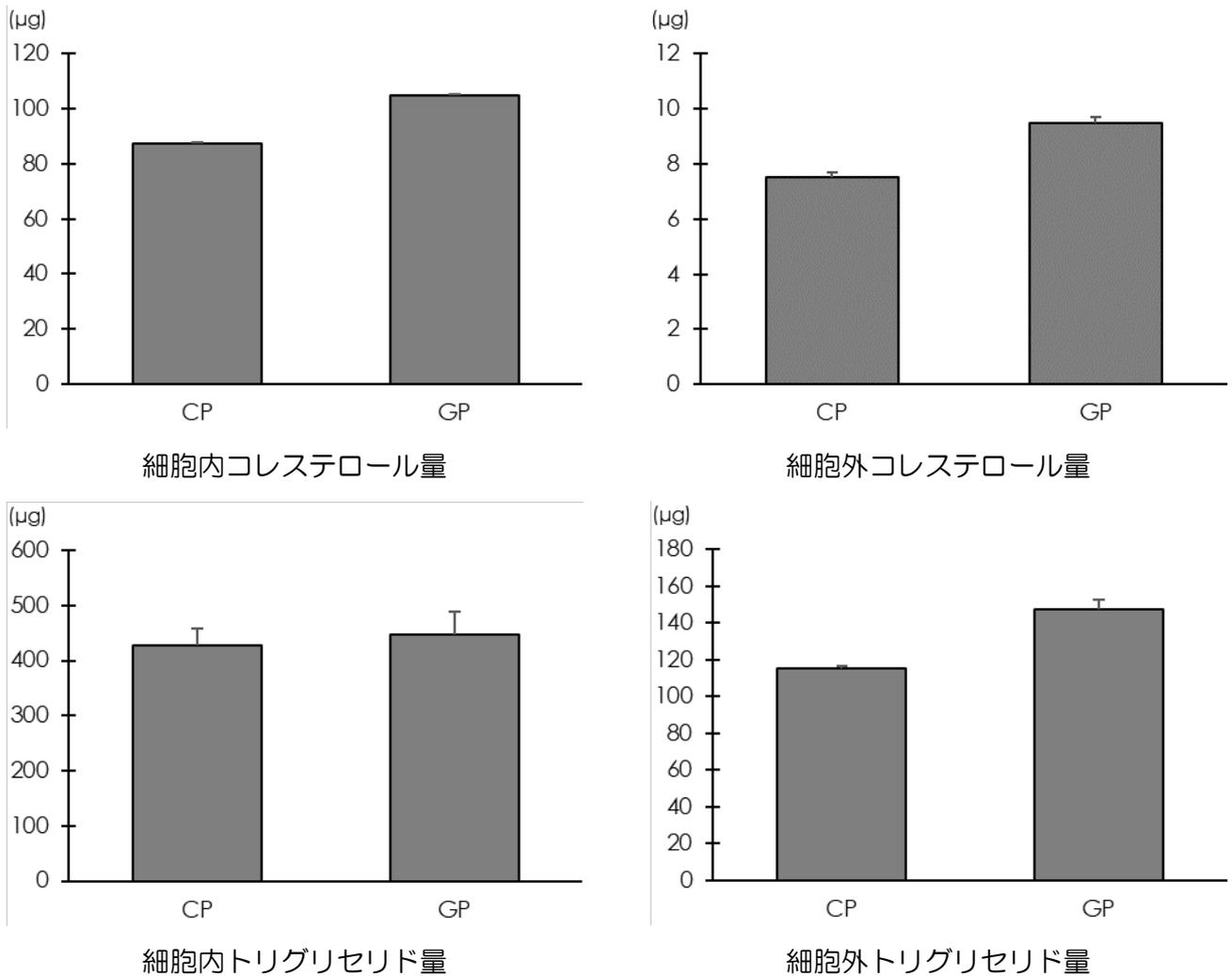


Fig 4. ③の細胞外/細胞内脂質量比較

2-1-2 PXB-cells LA の取り扱い方法の確立

④細胞播種濃度の設定 (初年度)

次の5段階の密度になるように播種し、PXB-cells LA の播種密度の違いが脂質代謝能に及ぼす影響を検証した。

播種密度 (単位は $\times 10^5$ cells/well)				
A : 1	B : 2	C : 4	D : 6	E : 10

密度 A、B、及び E において、細胞内脂質量及び培養上清中脂質量は著しく低下し、密度 C 及び D において、高値の細胞内脂質量及び培養上清中脂質量が確認された (Fig 5)。密度 D は C と比較してやや高値を示したが、播種密度比では逆に低下しており、密度 C が脂質代謝能を解析するために最適な密度であると考えられた。したがって、播種密度が 4×10^5 cells/well の条件において、脂質代謝能を解析するために最適な密度であることを確認した。

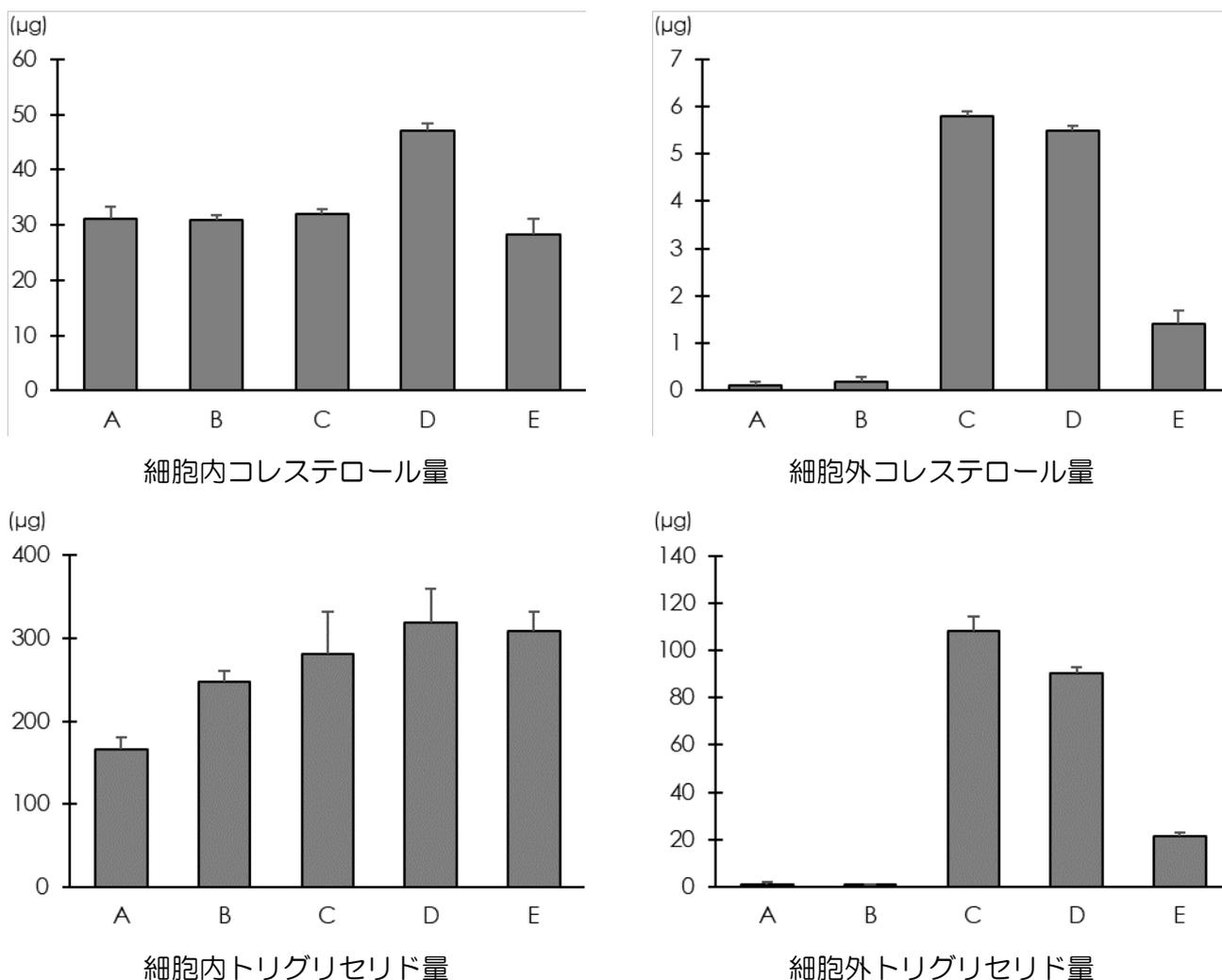


Fig 5. ④の細胞外/細胞内脂質量比較

⑤輸送期間の設定（初年度）

PXB-cells LA の完成後、この商品は株式会社フェニックスバイオで播種された後、エンドユーザーに輸送される。これまでの当社の実績から、海外輸送の場合、輸送物は最大5日間、輸送環境下におかれる。そこで、想定外の事態により輸送期間が7日となった場合も含め、PXB-cells LA の輸送期間の長期化が脂質代謝能に及ぼす影響を検証した。

T1 と比較して、T5 及び T7 の培養上清中脂質量（トリグリセリド）は増加した（Fig 6）。したがって、輸送環境による脂質代謝能への影響は極めて少ないことが推察された。このことから、想定される輸送期間（最大5日間）において、PXB-cells LA の脂質代謝能に影響はないことを確認した。

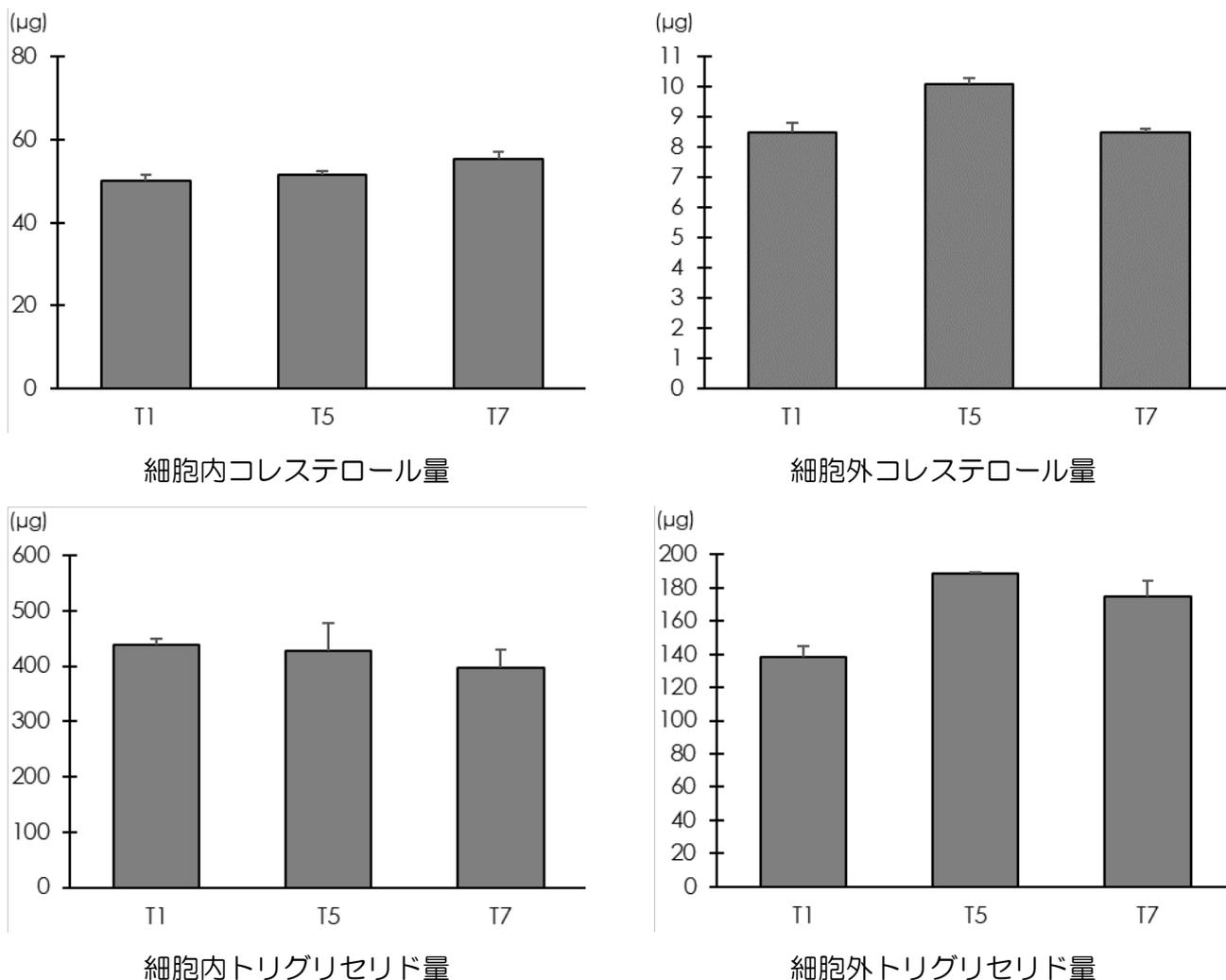


Fig 6. ⑤の細胞外/細胞内脂質量比較

⑥維持培養期間の設定及び従来素材との比較（初年度）

PXB マウスから取り出した新鮮なヒト肝細胞では播種した後、細胞内に蓄積された脂肪滴が徐々に消失することが細胞形態の観察像から分かっている。そこで、播種後の維持培養期間（播種後 10 日、13 日、15 日）の延長が細胞代謝能に及ぼす影響を検証した。また、あわせて従来素材となるヒト肝臓がん由来株化細胞（HepG2 及び HuH-7）の脂質代謝能についても検証を行った。

その結果、各維持培養期間とも、安定した細胞外脂質量を示しながらも、播種後 6 日の PXB-cells LA と比較して播種後 10~15 日の細胞内脂質量は低値を示していた（Fig 7）。このことから、生体時の肝細胞内に蓄積した PXB-cells LA の脂質は播種後 10 日間の維持培養により、ほぼ消失すると推察される。そのため、PXB-cells LA の正常肝としての脂質代謝能を評価するためには脂質蓄積量が落ち着いた播種後 10 日以上 of 細胞を使用することが好ましいと考えられた。

また、PXB-cells LA はヒト肝臓がん由来株化細胞と比較して高いレベルの細胞外脂質量が確認され（Fig 8）、分泌した脂質の 80%以上が超低密度リポタンパク質（VLDL）である

ことが確認された (Fig 9)。一方、ヒト肝臓癌由来株化細胞は殆どが低密度リポタンパク質 (LDL) 若しくは高密度リポタンパク質を分泌していることも確認した (Fig 9)。加えて、各細胞種のリポタンパク質プロファイルは全く異なる事が確認された (Fig 10)。正常な肝臓は VLDL を血中に分泌することが知られており、PXB-cells LA が *in Vitro* において、ヒトの正常な脂質代謝機能を維持していることが示された。

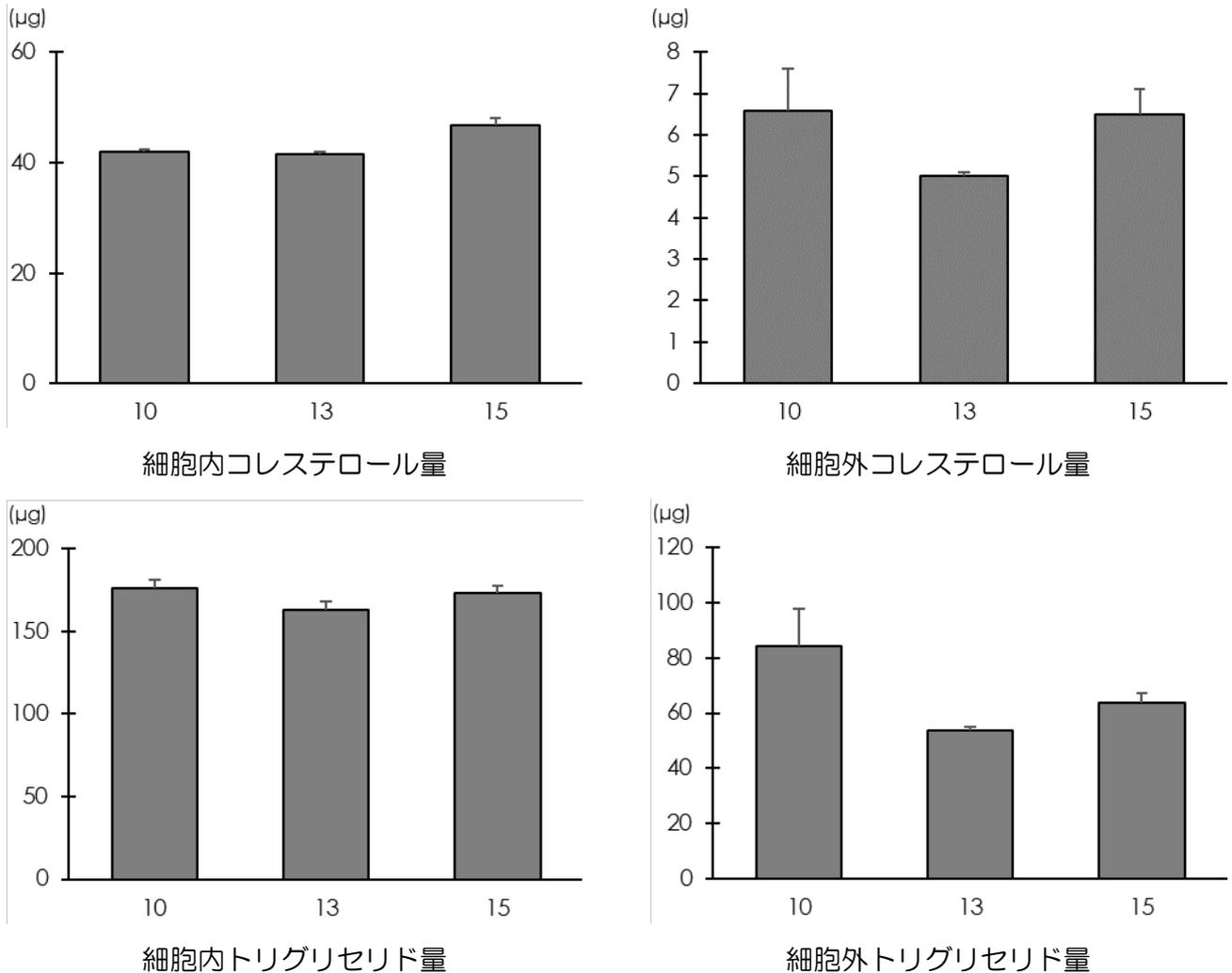
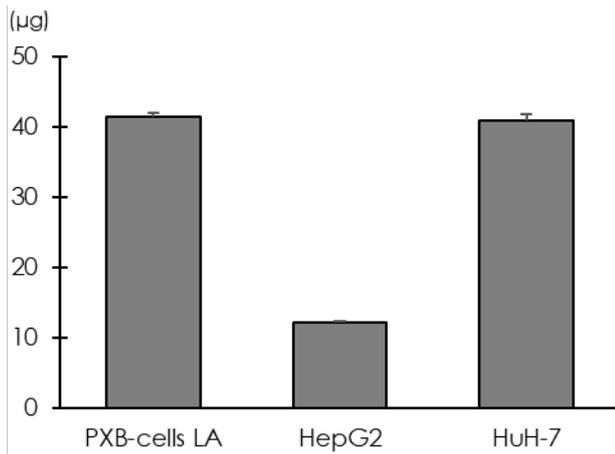
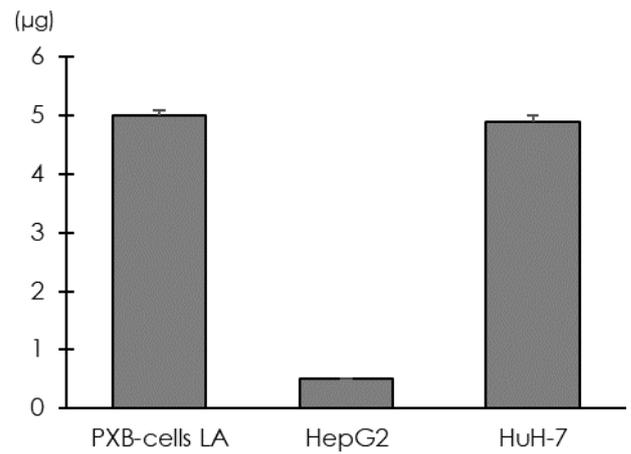


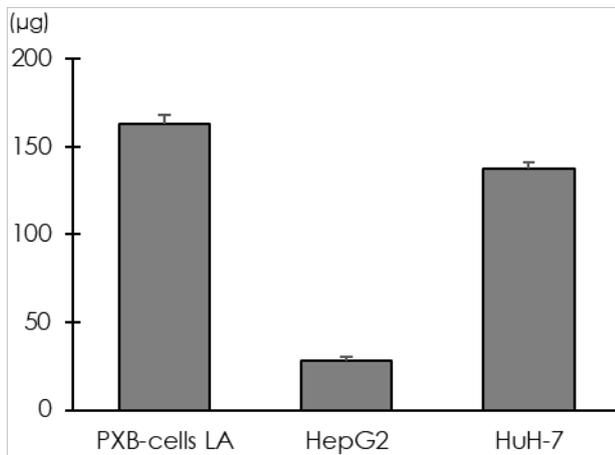
Fig 7. ⑥の細胞外/細胞内脂質量比較 (PXB-cells LA 培養期間の比較)



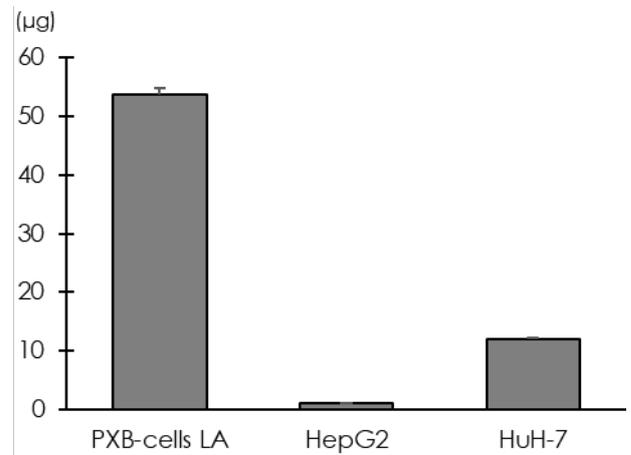
細胞内コレステロール量



細胞外コレステロール量

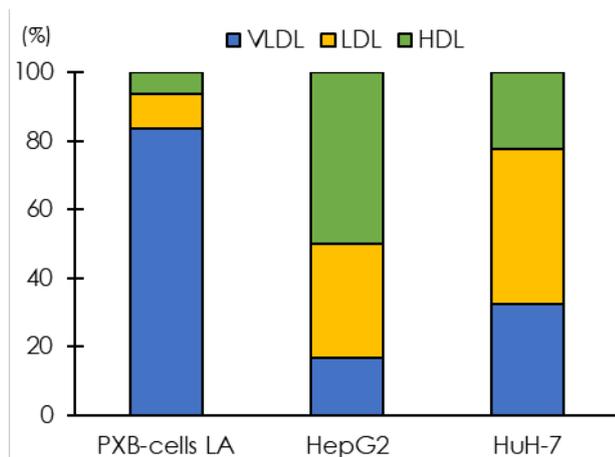


細胞内トリグリセリド量

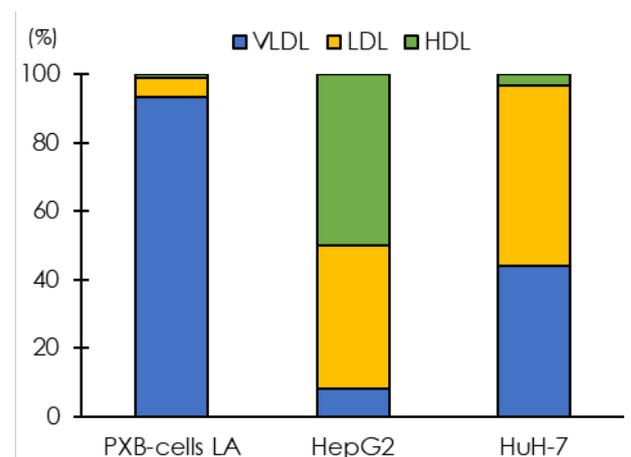


細胞外トリグリセリド量

Fig 8. ⑥の細胞外/細胞内脂質量比較（肝臓由来細胞の比較）



細胞外コレステロール



細胞外トリグリセリド

Fig 9. ⑥の細胞外脂質のリポタンパク質構成比較（肝臓由来細胞の比較）

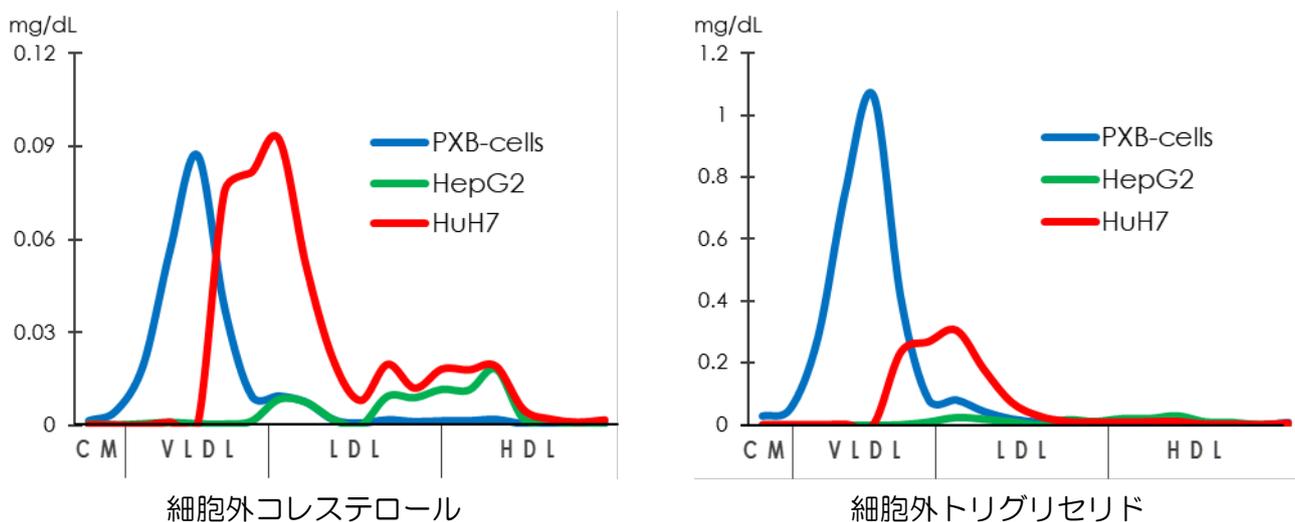
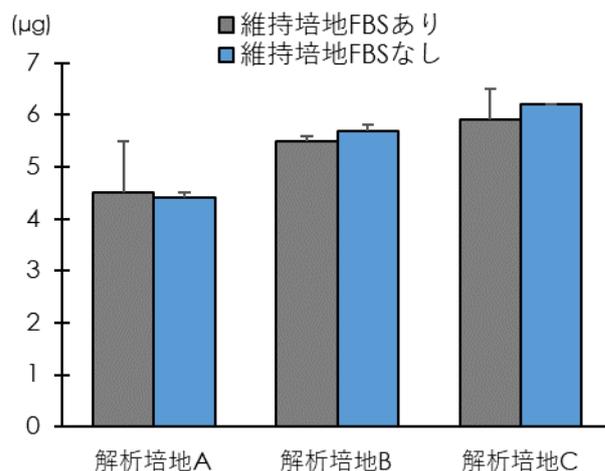
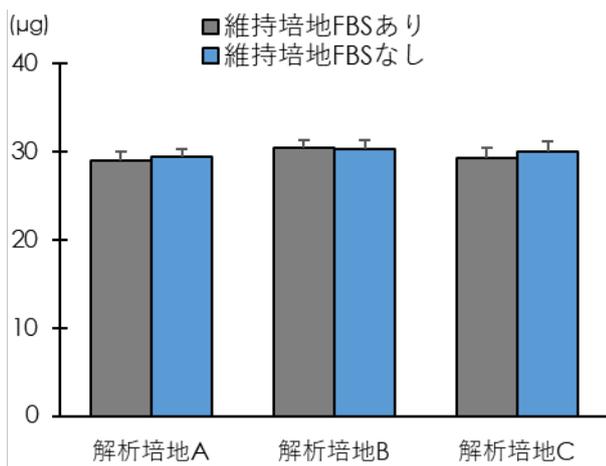


Fig 10. ⑥の細胞外脂質のリポタンパク質プロファイル比較
(肝臓由来細胞の比較)

⑦輸送・培養培地及び解析用培地の設定（初年度）

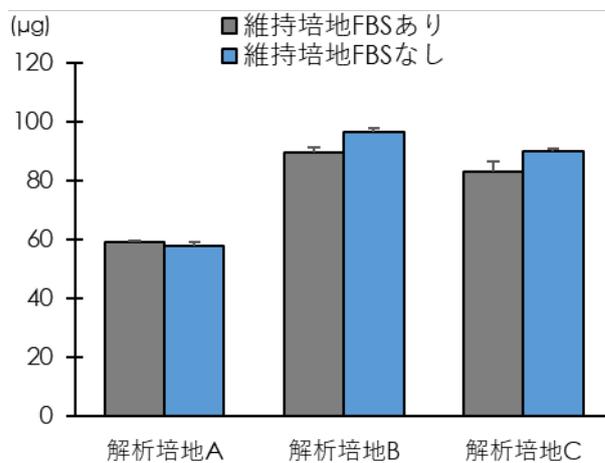
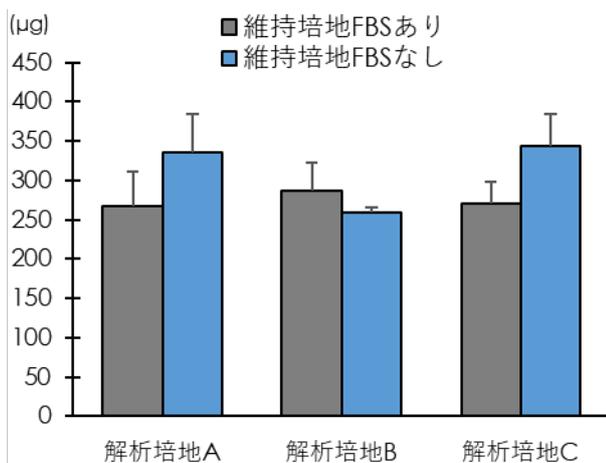
PXB-cells の維持培地にはウシ胎児血清（Fatal Bovine Serum：FBS）が含まれている。FBS は海外に輸送する際に検疫対象となる国が多く、PXB-cells を海外輸送する際は FBS を除去した維持培地を使用している。また、FBS には脂質を構成するリポタンパク質が豊富に含まれており、PXB-cells LA の分泌するリポタンパク質との混同を避けるために、解析にあたっては FBS を除去する必要がある。そこで、輸送時の維持培地中の FBS の有無、及び脂質解析用培地（3 種）での培養条件下における脂質代謝能への影響を検証した。

その結果、維持培地の FBS 添加/不添加の違いにおける細胞内/細胞外脂質量に変化は認められなかった（Fig 11）ことから、輸送時の培地中 FBS の有無は脂質代謝能に影響を及ぼさないと考えられた。また、解析培地 B 及び C の培養上清中脂質量は解析培地 A よりも高値を示した（Fig 11）ため、正確な脂質代謝能を解析するための解析培地は B 又は C が適すると考えられた。エンドユーザーの試薬調製法の簡易化を考慮した場合、調合する試薬数が少ない解析培地 B が解析に適する培地であると考えられた。



細胞内コレステロール量

細胞外コレステロール量



細胞内トリグリセリド量

細胞外トリグリセリド量

Fig 1 1. ⑦の細胞外/細胞内脂質量比較

2-1-3 中括

本節では、2-1 PXB-cells LA の基本的生産方法及び取り扱い方法の確立に係る、1. PXB マウスからのPXB-cells LA の取り出し方法の確立、2. PXB-cells LA の取り扱い方法の確立について検討した結果を報告した。

各検討項目について確認された条件及び手順から、PXB-cells LA を使用した脂質代謝能の解析を行うための最適条件を確立した。次年度の検討では本節で設定した条件を基に検証をすすめた。

2-2 PXB-cells LA の脂質代謝機能確認・調整

2-2-1 PXB-cells LA の脂質合成遺伝子・タンパク発現量の測定

『2. PXB-cells LA の取り扱い方法の確立』の結果から、1. PXB-cells LA は培養期間の長短により脂質分泌量及び細胞内脂質量が変化する、2. PXB-cells LA の脂質分泌量及びリポタンパク質プロファイルは、従来素材であるヒト肝臓がん由来株化細胞（HepG2 及び HuH7）と著しく異なることが明らかとなった。

これらのメカニズムを解明するため、遺伝子及びタンパク発現量について解析を行った。遺伝子発現解析には、リアルタイム PCR 及びマイクロアレイ法を用いた。また、タンパク質解析にはウエスタンブロット法及び ELISA 法を用いた。

⑧遺伝子発現比較（リアルタイム PCR 法）（初年度）

PXB-cells LA は、ヒト肝臓がん由来株化細胞と比較して大半の遺伝子発現量が高値を示した（Table 4）。

⑨タンパク質発現比較（ELISA 法）（最終年度）

PXB-cells LA は、ヒト肝臓がん由来株化細胞と比較して上清中アポリポタンパク質量が高値を示した。また、PXB-cells LA はヒト肝臓がん由来株化細胞と異なり、VLDL の特異アポリポタンパク質である ApoC3 の発現が確認された（Fig 1 2）。

⑩タンパク質発現比較（ウエスタンブロット法）（初年度）

PXB-cells LA は、ヒト肝臓がん由来株化細胞と比較して脂肪酸転移反応系タンパク量が高値を示した（Fig 1 3）。

⑪遺伝子発現比較（マイクロアレイ法）（初年度）

PXB-cells は維持培養の経過に伴い、遺伝子発現パターンが変化することが確認された。また、PXB-cells LA はヒト肝臓がん由来株化細胞と大きく異なる遺伝子発現パターンを有することが確認された（Fig 1 4）。

遺伝子発現パターン解析から、PXB-cells LA はヒト肝臓がん由来株化細胞とは大きく異なり、また維持培養期間の長短によっても細胞機能に変化が生じていると推察された。また、PXB-cells LA の高レベルの VLDL 分泌能は脂肪酸転移反応系の遺伝子発現ならびにタンパク質発現によるものであると考えられた。

PXB-cells LA はヒト肝臓がん由来株化細胞と大きく異なる遺伝子発現パターンを示すことが確認された。また、維持培養期間の長短によっても発現パターンに変化を示すことを確認した。あわせて、PXB-cells は脂質代謝関連の遺伝子発現量が高いことに加え、脂肪酸転移反応系及び VLDL 特異アポリポタンパクの発現量が高い事を確認した。

Table 4. ⑧の各肝臓由来細胞の遺伝子発現比 (HepG2 を 1.0 とした場合の発現量)

遺伝子名	PXB-cells LA	HepG2	HuH-7
ApoA1	3.1	1.0	2.0
ApoB100	2.2	1.0	0.7
ApoA5	2.6	1.0	<0.1
ApoC3	81.1	1.0	7.3
MTTP	4.9	1.0	2.3
MGAT1	16.7	1.0	1.1
MGAT2	3.6	1.0	0.1
MGAT3	1.0	1.0	0.8
DGAT1	3.1	1.0	3.3
DGAT2	6.0	1.0	3.6
GPAT	13.4	1.0	1.2
Lipin1	2.2	1.0	1.1
SREBP2	1.6	1.0	0.9
HMGCoAR	0.8	1.0	1.1
CETP	<0.1	1.0	<0.1
SREBP1c	18.1	1.0	17.9
FAS	2.5	1.0	2.4
SCD	1.8	1.0	1.5
ACSL1	45.7	1.0	3.0
ACC	1.5	1.0	1.1
HTGL	5.2	1.0	9.5
PCSK9	0.4	1.0	1.1
ANGPTL3	3001.6	1.0	2463.3
ANGPTL4	29.5	1.0	1.3
ANGPTL8	7.6	1.0	<0.1
Albumin	21.6	1.0	3.3
CYP1A2	2451.9	1.0	0.8
CYP2C9	7160.7	1.0	86.3
CYP2B6	1.6	1.0	0.1
CYP3A4	1363.6	1.0	15.2
CYP7A5	16.9	1.0	1.1
GLUT2	7.6	1.0	1.2
LDLR	0.8	1.0	0.6
SR-BI	2.2	1.0	0.7
OATPB1	198.4	1.0	8.7
NPC1L1	3.3	1.0	0.4
ABCA1	2.5	1.0	2.2
PPAR α	3.5	1.0	1.4
PGC1 α	1.0	1.0	0.4
ACOX1	7.2	1.0	1.2
SLC25A20	10.5	1.0	4.6
PEPCK	109.2	1.0	0.7

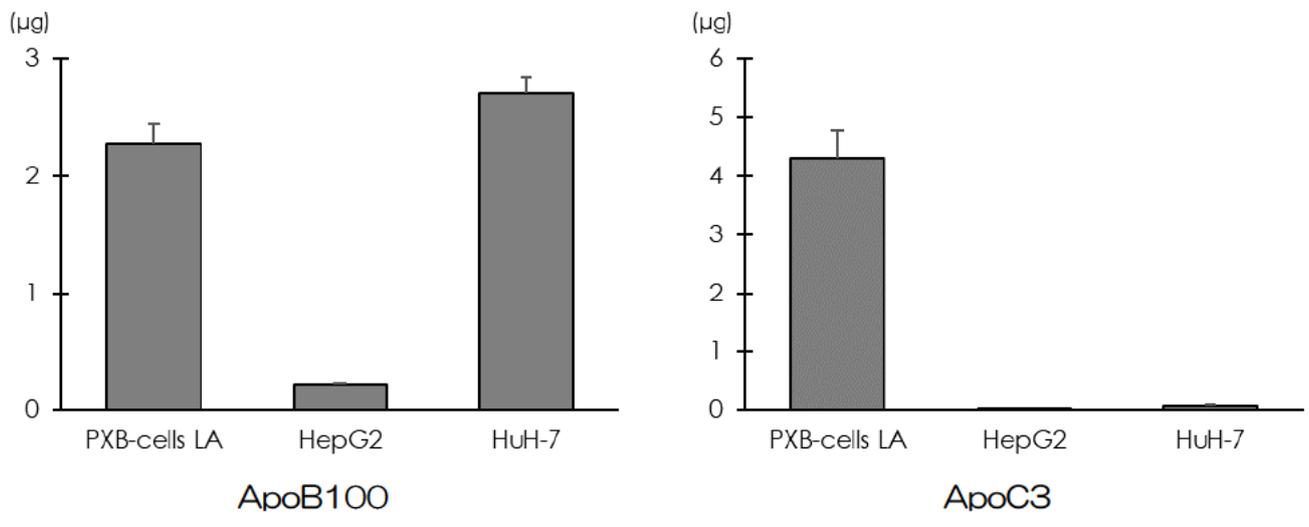


Fig 1 2. ⑨の細胞外のアポリポタンパク (ApoB100 及び ApoC3) 量比較

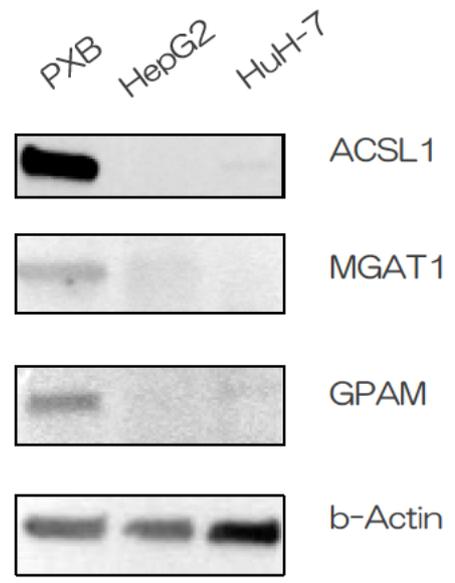
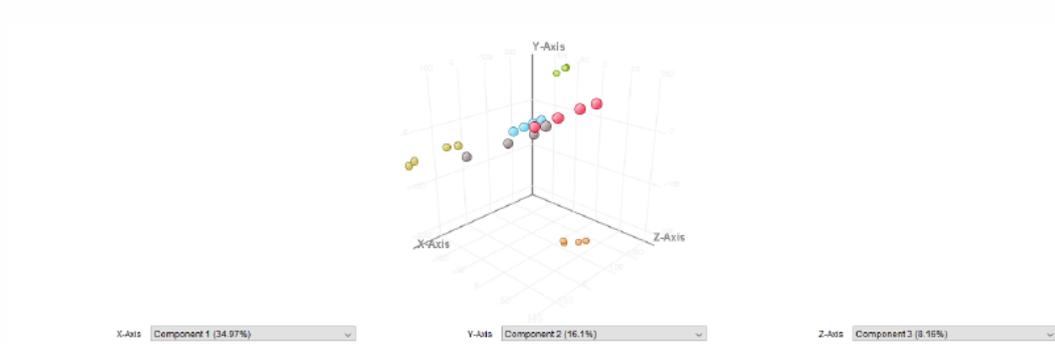


Fig 1 3. ⑩の細胞内の脂質代謝関連タンパク質発現比較

3D PCA Scores Report

Experiment : 20190215
Active entity list : All Entities
X-Axis : Component 1 (34.97%)
Y-Axis : Component 2 (16.1%)
Z-Axis : Component 3 (8.16%)



Color by Cell

■ Day03	■ Day06	■ Day13
■ Day15	■ Hep G2	■ HuH-7

Description

Algorithm: Principal Components Analysis

Parameters:

Column indices = [1-24]

Pruning option = [numPrincipalComponents, [6]]

Mean centered = true

Scale = true

3-D scores = true

PCA on = Columns

Fig 1 4. ⑪の遺伝子発現比較（主成分解析）

2-2-2 PXB-cells LA の化学物質による脂質合成・分解機能に対する影響

⑫予備試験（用量設定試験）（最終年度）

『2-2-1 PXB-cells LA の脂質合成遺伝子・タンパク発現量の測定』の結果から PXB-cells LA は従来細胞と比較して高い脂質代謝機能を有することが確認された。

そこで、PXB-cells LA が、非臨床・臨床試験において脂質への影響が報告されている化学物質に対してどのような反応を示すか確認した。濃度の設定は過去の報告例を参照し、その濃度を基準とした非添加群を含む4濃度とした。なお、各群の例数は1とした。

その結果、化学物質の添加による影響については以下の通りであった。

品名	項目	結果	Fig
シンバスタチン	培養上清	効果が確認できた	15
フェノフィブラート	培養上清	効果が確認できた	16
ロミタピド	培養上清	効果が確認できた	17
プロブコール	培養上清	効果が確認できた	18
エゼチミブ	なし	効果が確認できなかった	19
エボロクマブ	なし	効果が確認できなかった	20
オレイン酸	培養上清、細胞内	効果が確認できた	21
ラクトフェリン	培養上清	効果が確認できた	22
エゴマエキス	細胞内	効果が確認できた	23
ジュンサイパウダー	細胞内	効果が確認できた	24

シンバスタチン、フェノフィブラート、ロミタピド、プロブコール、オレイン酸、及びラクトフェリンについては、化学物質を添加することで、培養上清中の脂質量に変化が認められた。これらは、過去に報告された非臨床・臨床試験と同様の結果であった。したがって PXB-cells LA を用いることで、脂質代謝に関わる化学物質の評価が可能であることが示された。

エゼチミブは、小腸壁に存在するタンパク質を主に標的としている医薬品であり、肝臓（肝細胞）における効果は限定的であると考えられた。

エボロクマブは、血液中に存在するタンパク質と結合することで、肝細胞の LDL 取り込みに関わるタンパク質の分解を抑制し、血中の LDL 量を低下させる効果を有する。解析培地には LDL が含まれていないため、正しく評価するためには工夫が必要であると考えられた。エゴマエキス及びジュンサイパウダーについては、細胞内脂質にのみ変化が認められた。

得られた知見より、⑬本試験の用量について、以下の通り設定した。

- ・シンバスタチン、フェノフィブラート、ロミタピド、プロブコール、オレイン酸、及びラクトフェリンについて、脂質量に変化が認められ、ヒトアルブミン量の低下が軽微であった用量を次試験における設定用量とした。
- ・エボロクマブについて、作用機序を考慮し、解析培地にリポタンパク質を含む血清（FBS）を加え、最高用量を次試験における設定用量とした。
- ・エゼチミブについて、薬剤の主な標的組織が異なる点から、次試験から除外した。
- ・エゴマエキス及びジュンサイパウダーは上清中脂質に変化が認められなかった点、（食品由

来ゆえの) 複合した化学物質である点、メカニズムの理解が難しい点を考慮し、次試験から除外した。

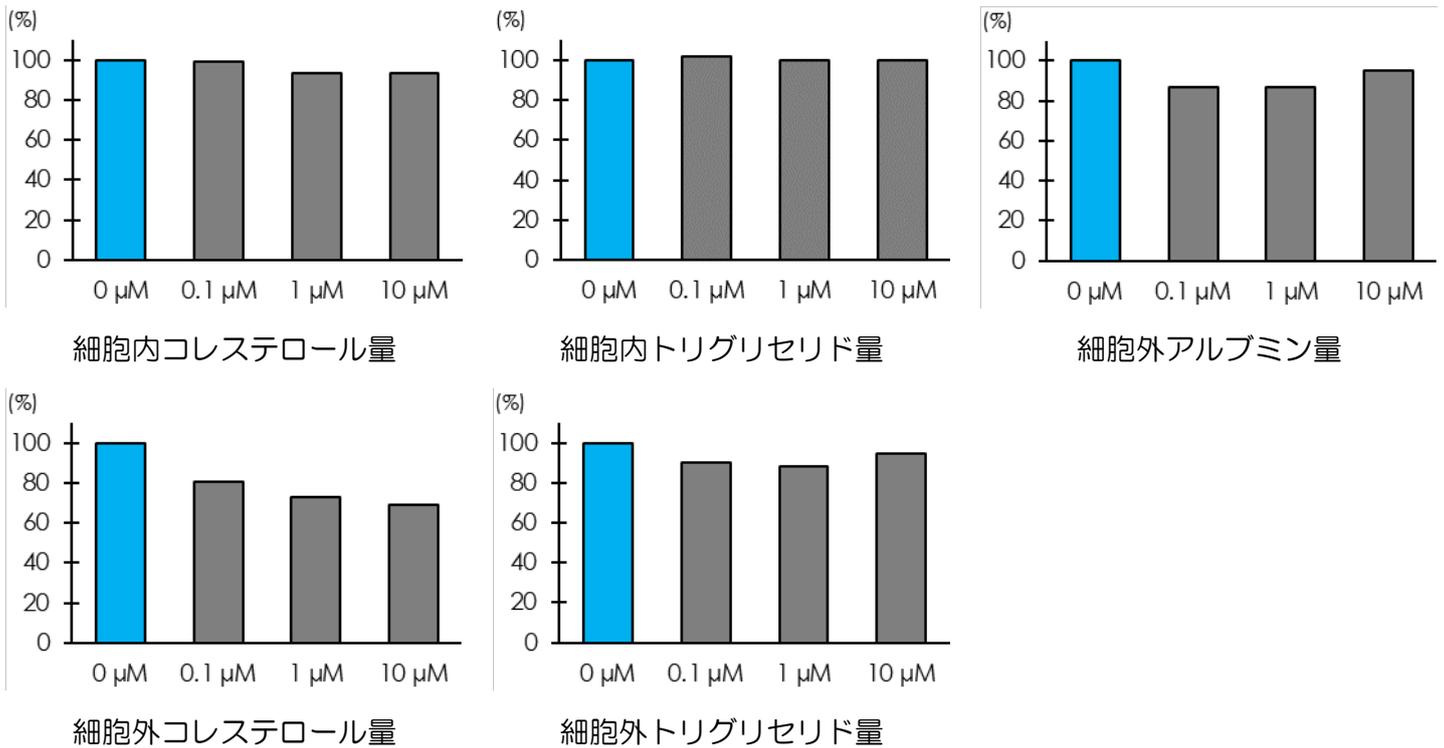


Fig 15. ⑫のシンバスタチン：未処置群 (0) を 100%とした時の相対値

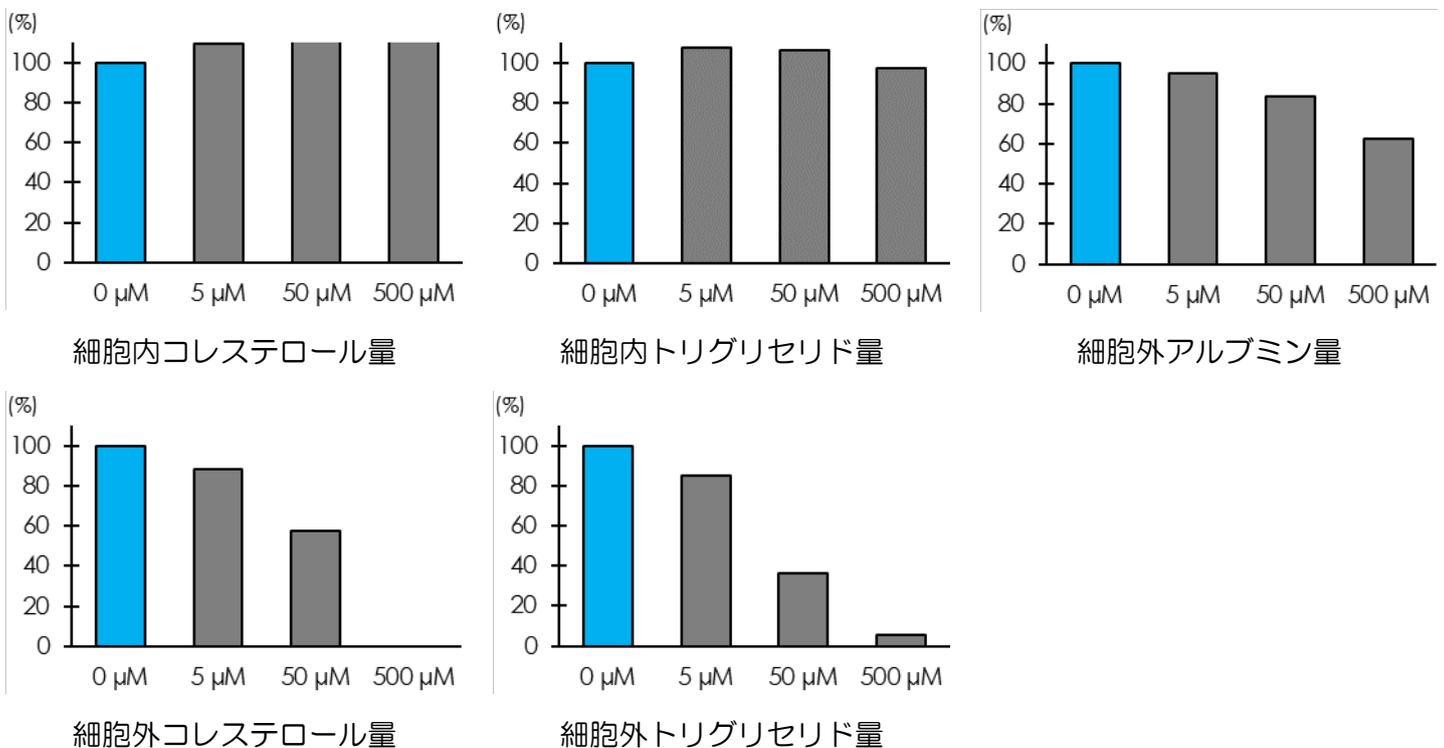
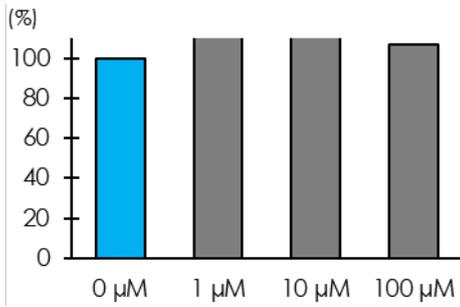
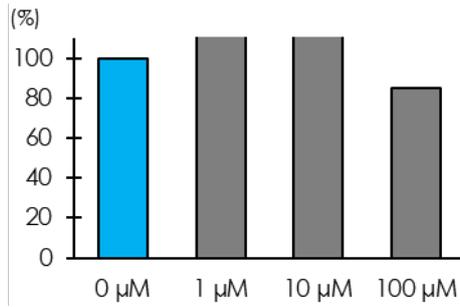


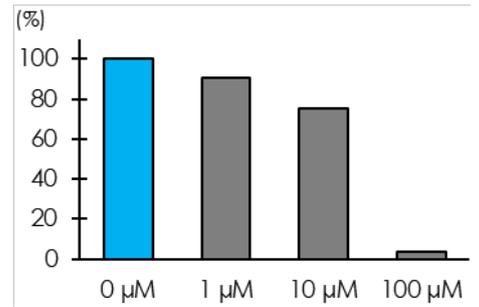
Fig 16. ⑫のフェノフィブラート：未処置群 (0) を 100%とした時の相対値



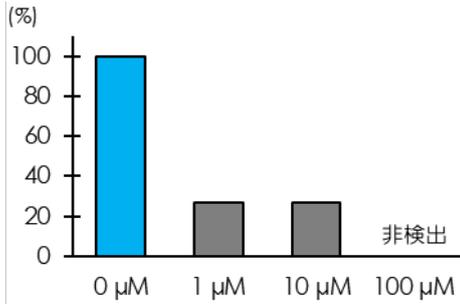
細胞内コレステロール量



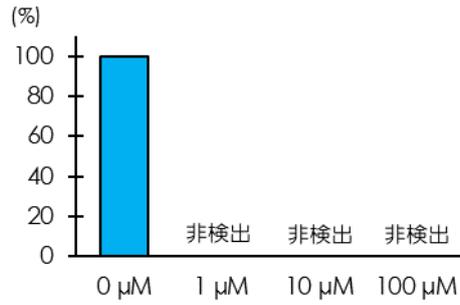
細胞内トリグリセリド量



細胞外アルブミン量

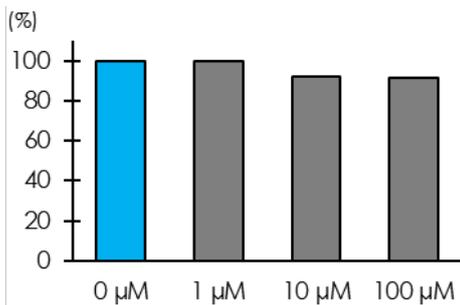


細胞外コレステロール量

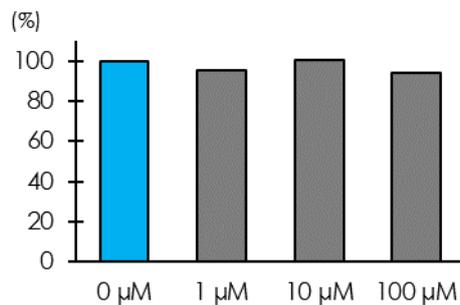


細胞外トリグリセリド量

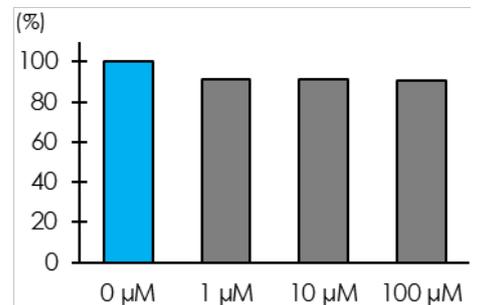
Fig 17. ⑫のロミタピド：未処置群 (0) を 100%とした時の相対値



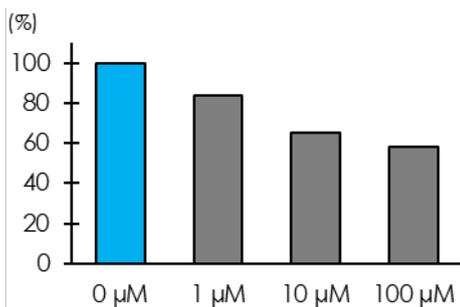
細胞内コレステロール量



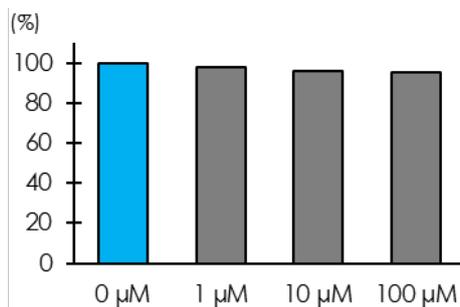
細胞内トリグリセリド量



細胞外アルブミン量

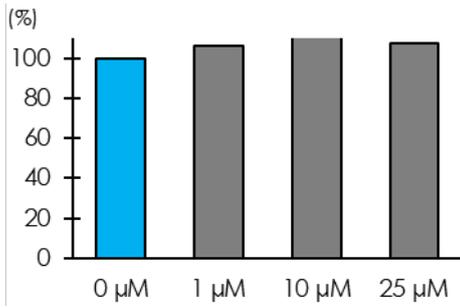


細胞外コレステロール量

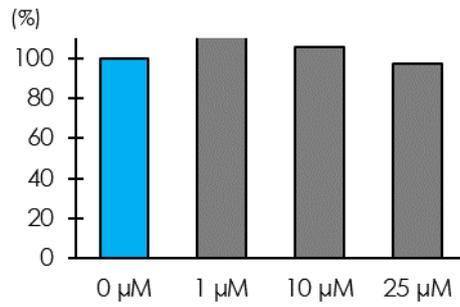


細胞外トリグリセリド量

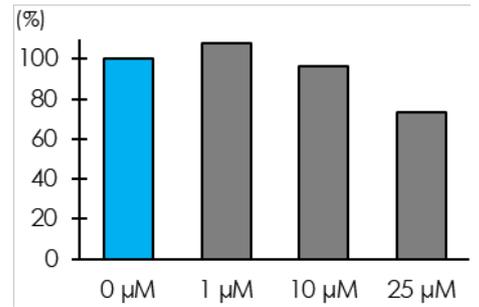
Fig 18. ⑫のプロブコール：未処置群 (0) を 100%とした時の相対値



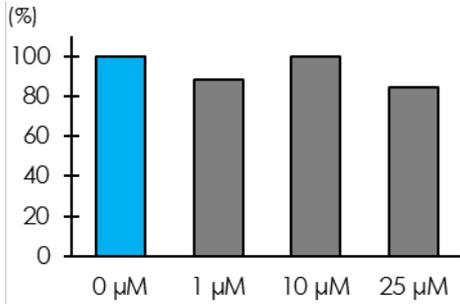
細胞内コレステロール量



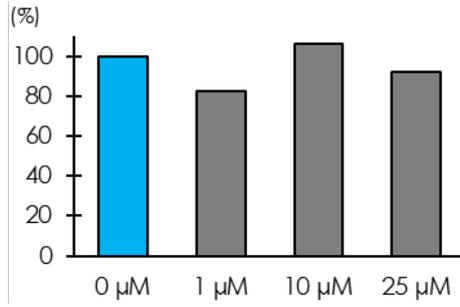
細胞内トリグリセリド量



細胞外アルブミン量

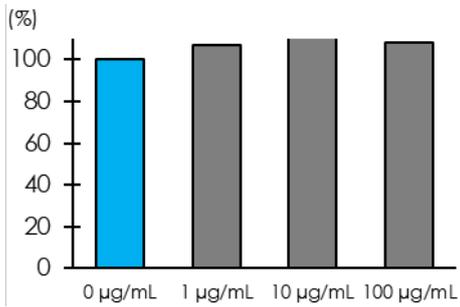


細胞外コレステロール量

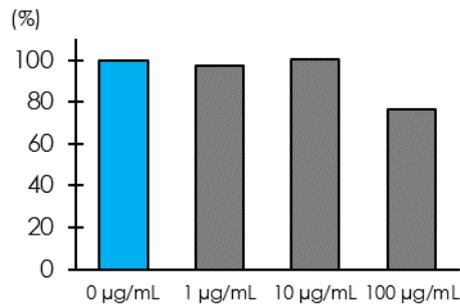


細胞外トリグリセリド量

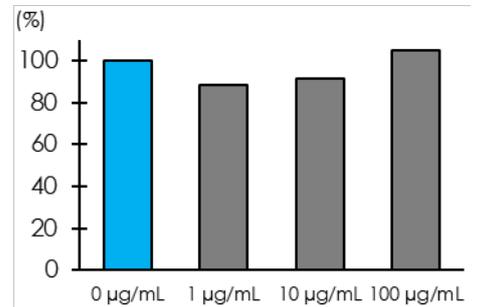
Fig 19. ⑫のエゼチミブ：未処置群 (0) を 100%とした時の相対値



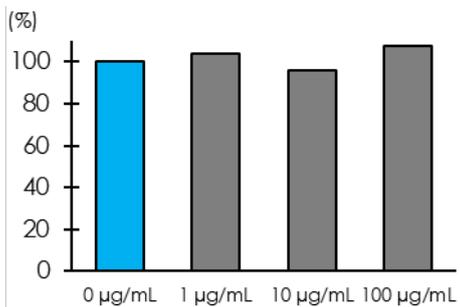
細胞内コレステロール量



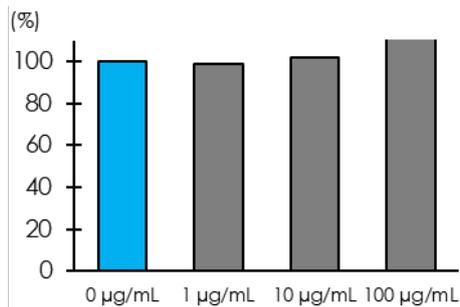
細胞内トリグリセリド量



細胞外アルブミン量

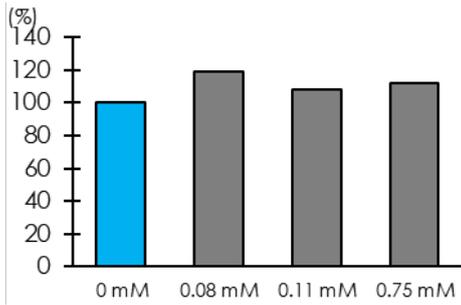


細胞外コレステロール量

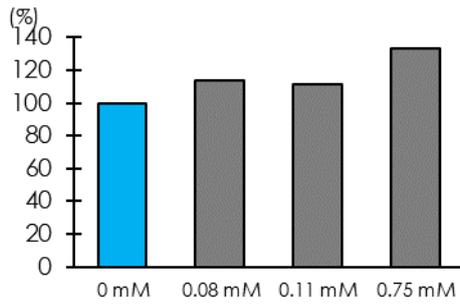


細胞外トリグリセリド量

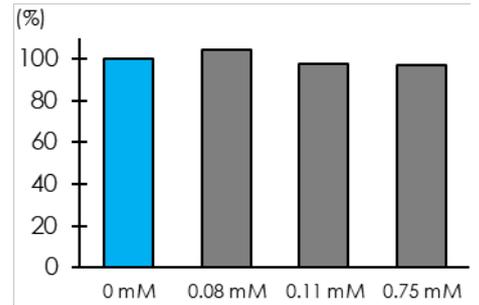
Fig 20. ⑫のエボロクマブ：未処置群 (0) を 100%とした時の相対値



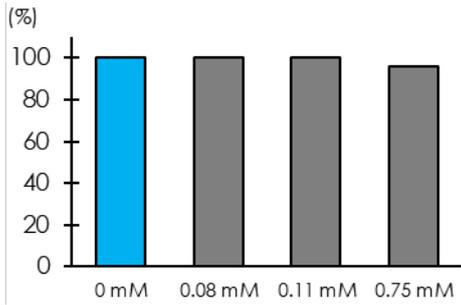
細胞内コレステロール量



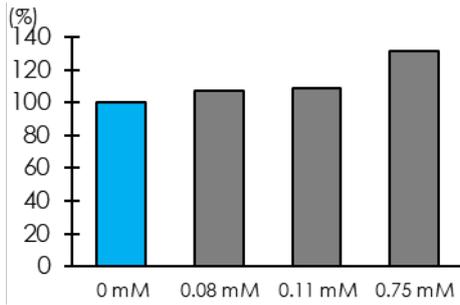
細胞内トリグリセリド量



細胞外アルブミン量

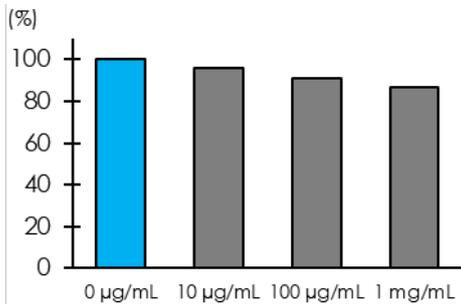


細胞外コレステロール量

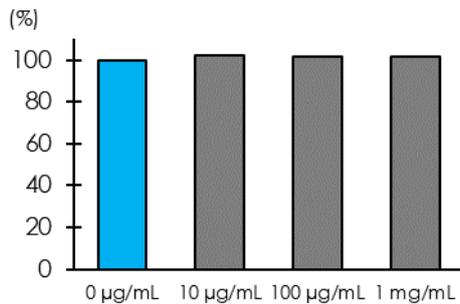


細胞外トリグリセリド量

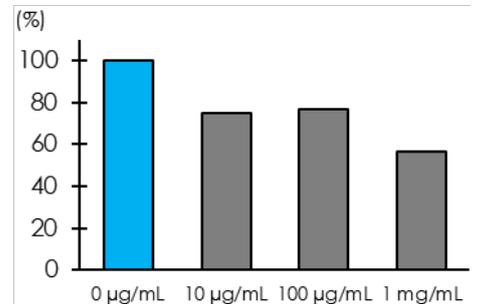
Fig 2 1. ⑫のオレイン酸：未処置群 (0) を 100%とした時の相対値



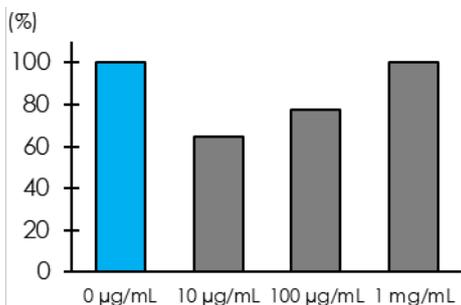
細胞内コレステロール量



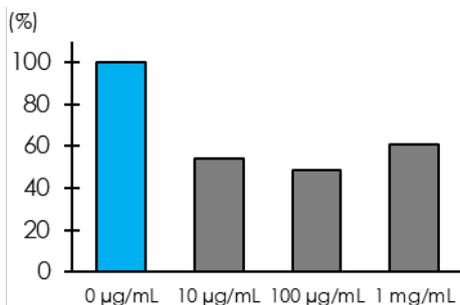
細胞内トリグリセリド量



細胞外アルブミン量

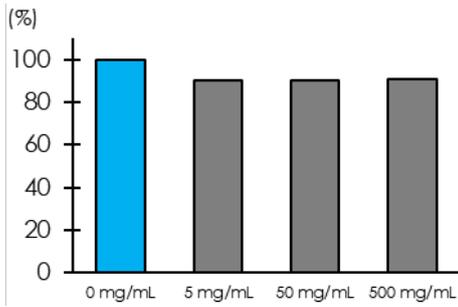


細胞外コレステロール量

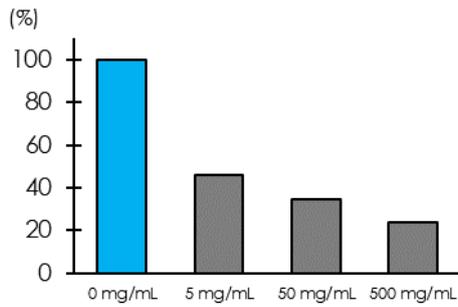


細胞外トリグリセリド量

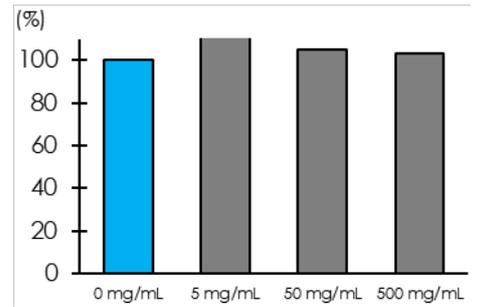
Fig 2 2. ⑫のラクトフェリン：未処置群 (0) を 100%とした時の相対値



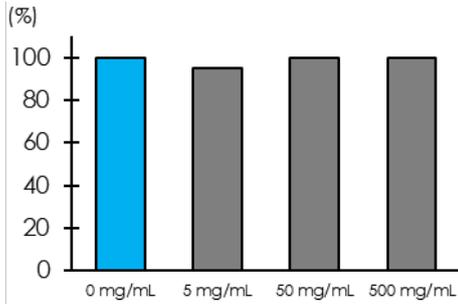
細胞内コレステロール量



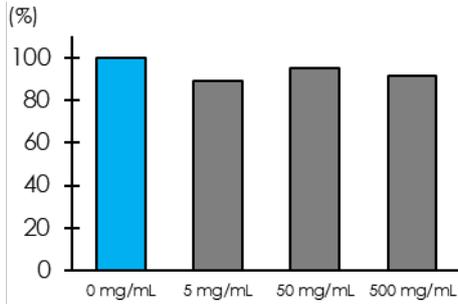
細胞内トリグリセリド量



細胞外アルブミン量

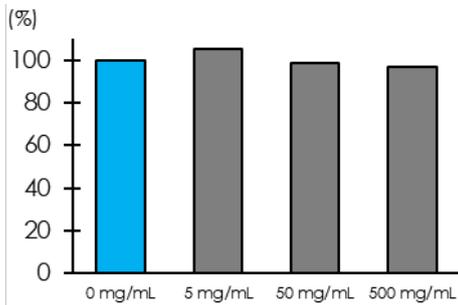


細胞外コレステロール量

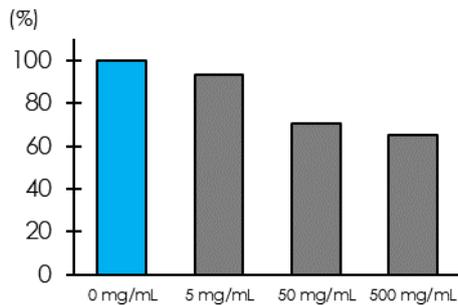


細胞外トリグリセリド量

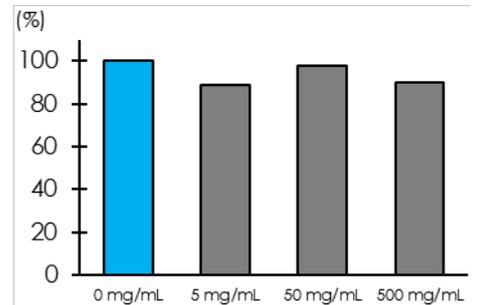
Fig 23. ⑫のエゴマエキス：未処置群 (0) を 100%とした時の相対値



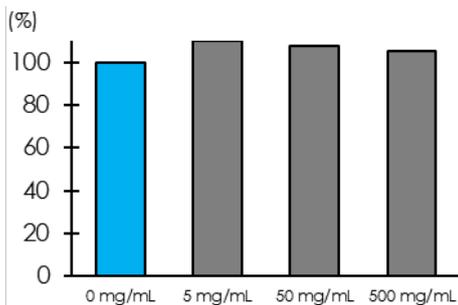
細胞内コレステロール量



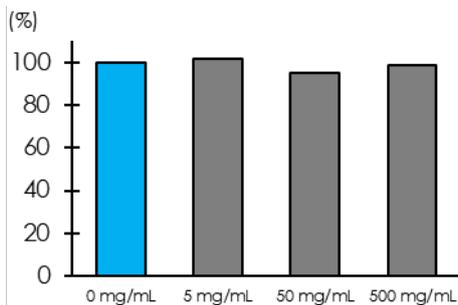
細胞内トリグリセリド量



細胞外アルブミン量



細胞外コレステロール量



細胞外トリグリセリド量

Fig 24. ⑫のジュンサイパウダー：未処置群 (0) を 100%とした時の相対値

⑬本試験（最終年度）

『⑫予備試験（用量設定試験）』の結果から、PXB-cells LA は非臨床・臨床試験において脂質への影響が報告されている大部分の化学物質に対して同様の効果を示す事が確認された。これら効果が正しい事を確認するために、予備試験で設定した用量を用い、例数を増やして（4例/群）試験を行った。

その結果、化学物質の添加による影響については以下の通りであった。

品名	項目	結果	Fig
シンバスタチン	培養上清	効果が確認できた	25
フェノフィブラート	培養上清	効果が確認できた	26
ロミタピド	培養上清	効果が確認できた	27
プロブコール	なし	効果が確認できなかった	28
エボロクマブ	なし	効果が確認できなかった	29
オレイン酸	培養上清、細胞内	効果が確認できた	30
ラクトフェリン	培養上清	効果が確認できた	31

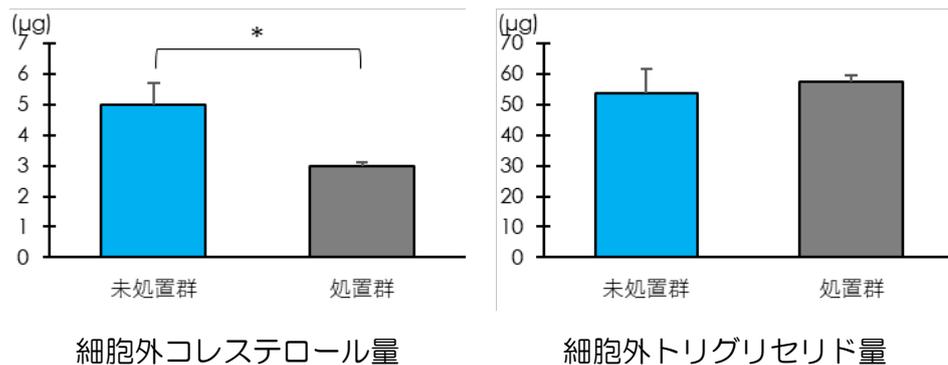
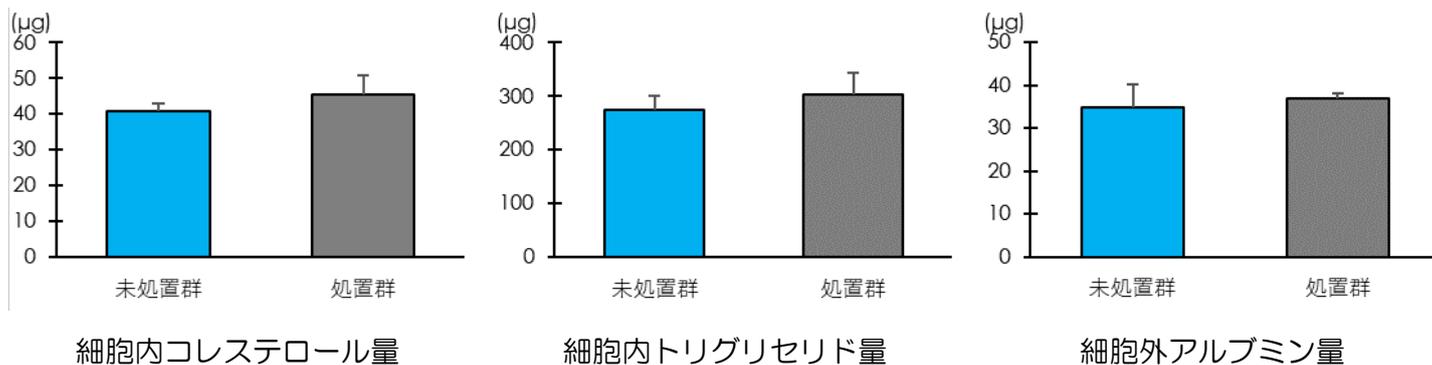
シンバスタチン、フェノフィブラート、ロミタピド、オレイン酸、及びラクトフェリンについては、『⑫予備試験（用量設定試験）』と同様の結果が得られた。

プロブコール及びエボロクマブについては、効果が確認できなかった。

プロブコールは、未処置群と比較して約 20%の上清中コレステロールの低下が確認されたものの、有意差は認められなかった。これは未処置群の脂質量のばらつきが顕著であることが要因であると考えられる。プロブコールの効果検証は、サポイン事業終了後に検証する。

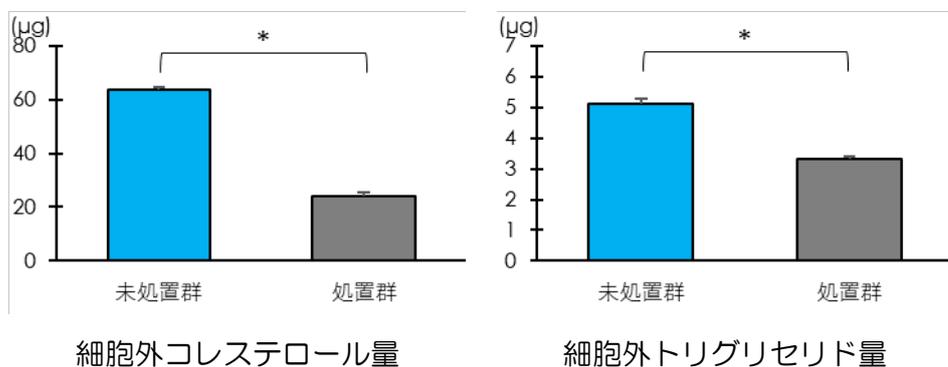
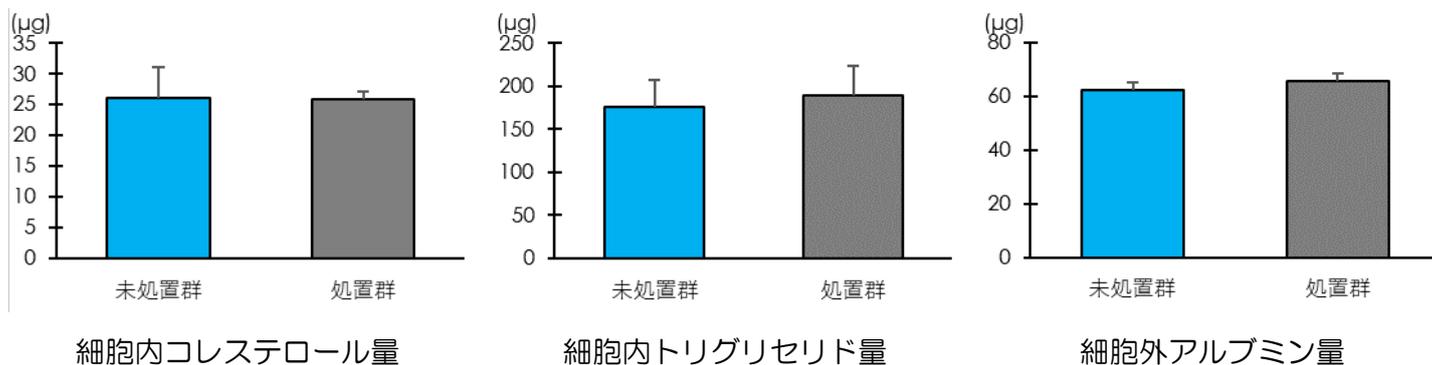
エボロクマブは、予備試験方法を改変し、LDL を豊富に含む FBS を化学物質と同時に添加することで、LDL 量の変化を確認したが、変化が認められなかった。エボロクマブは肝細胞単体を標的としている化学物質ではないため、その他の外部要因を考慮した試験方法を考慮する必要があると考えられた。

また、各化学物質を添加することで、遺伝子発現に変化が認められた（Fig 32）。具体的にどのように変化したかについては、サポイン終了後に解析を進める。



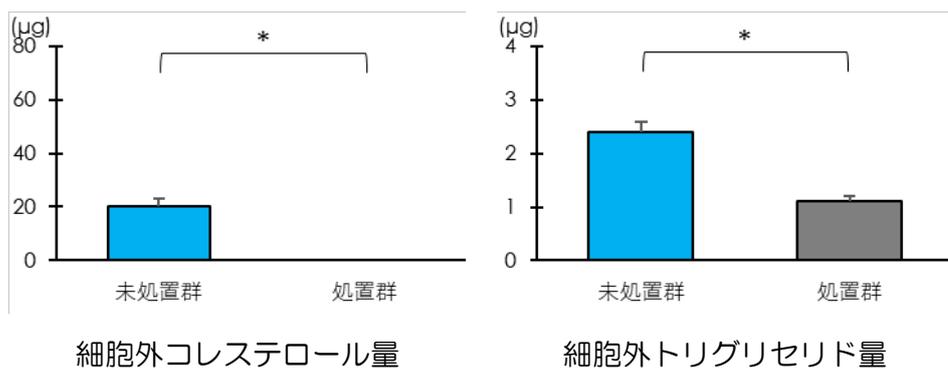
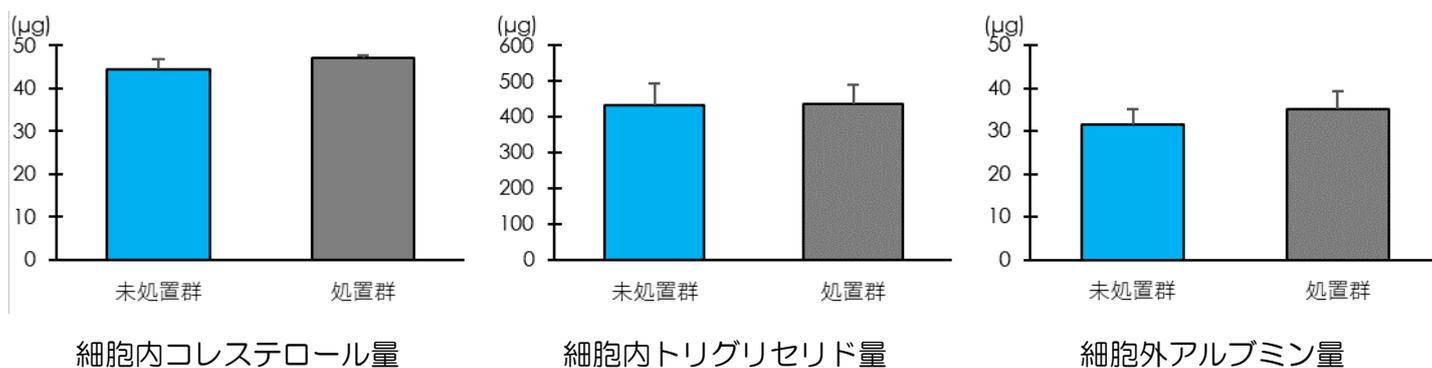
* : 有意差あり

Fig 25. ⑬のシンバスタチン (10 μM)



* : 有意差あり

Fig 26. ⑬のフェノフィブラート (100 μM)



* : 有意差あり

Fig 27. ⑬のロミタピド (1 μM)

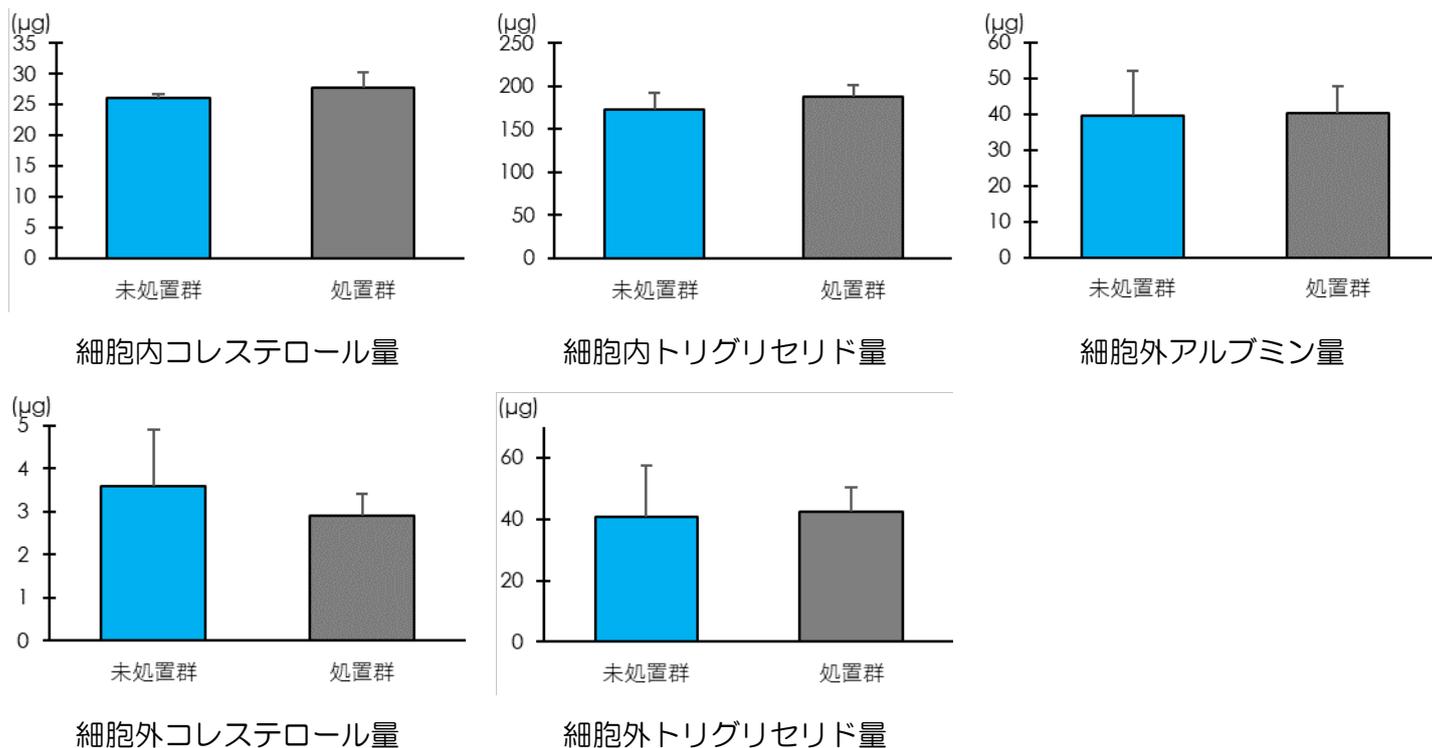


Fig 28. ⑬のプロブコール (100 μM)

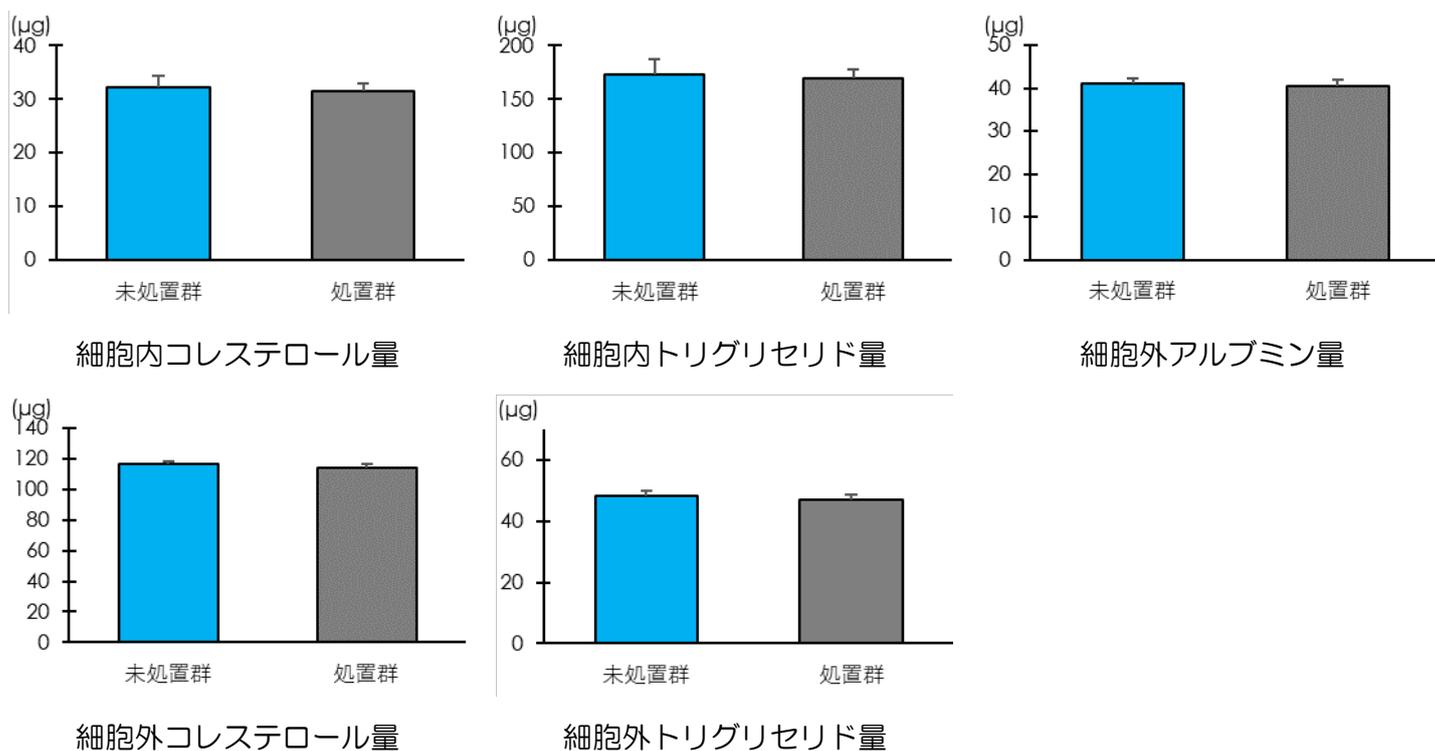
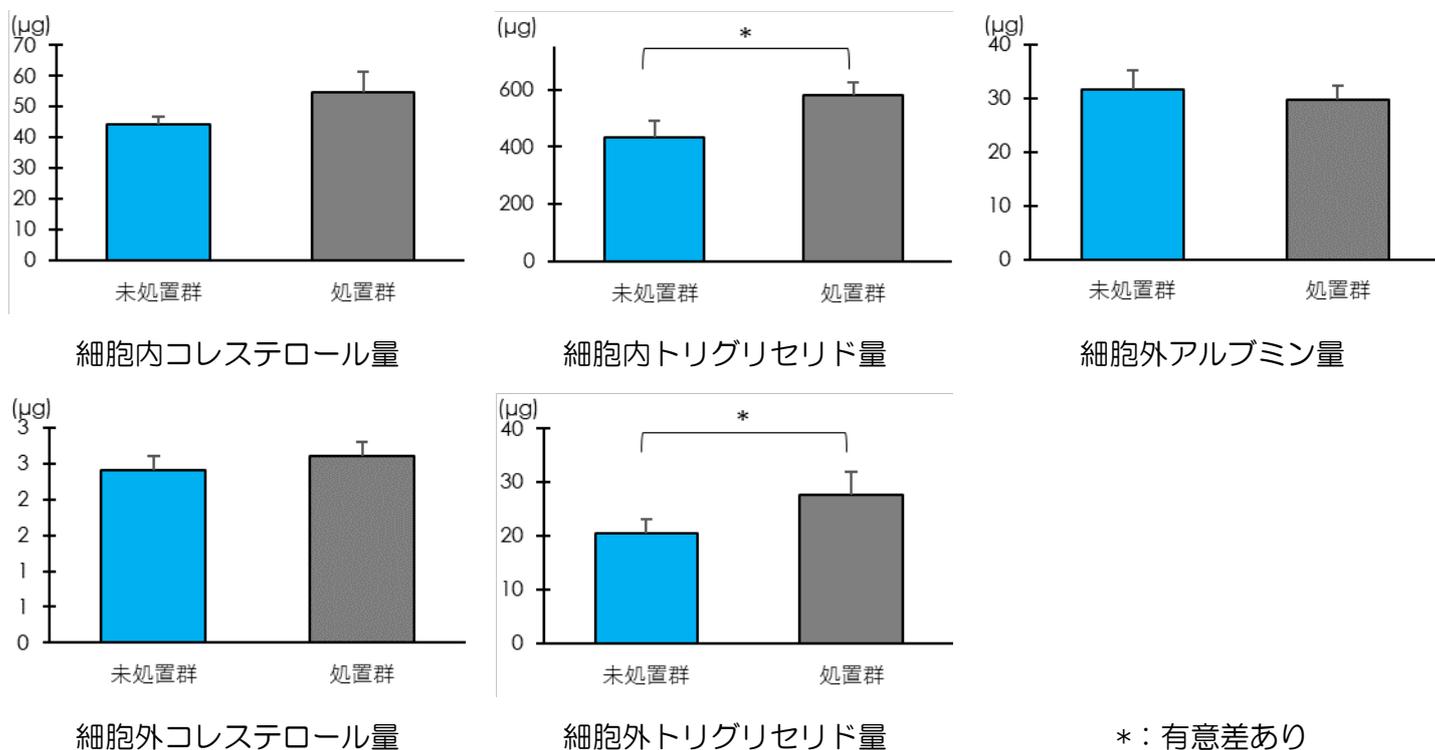


Fig 29. ⑬のエボロクマブ (100 µg/mL)



*: 有意差あり

Fig 30. ⑬のオレイン酸 (0.75 mM)

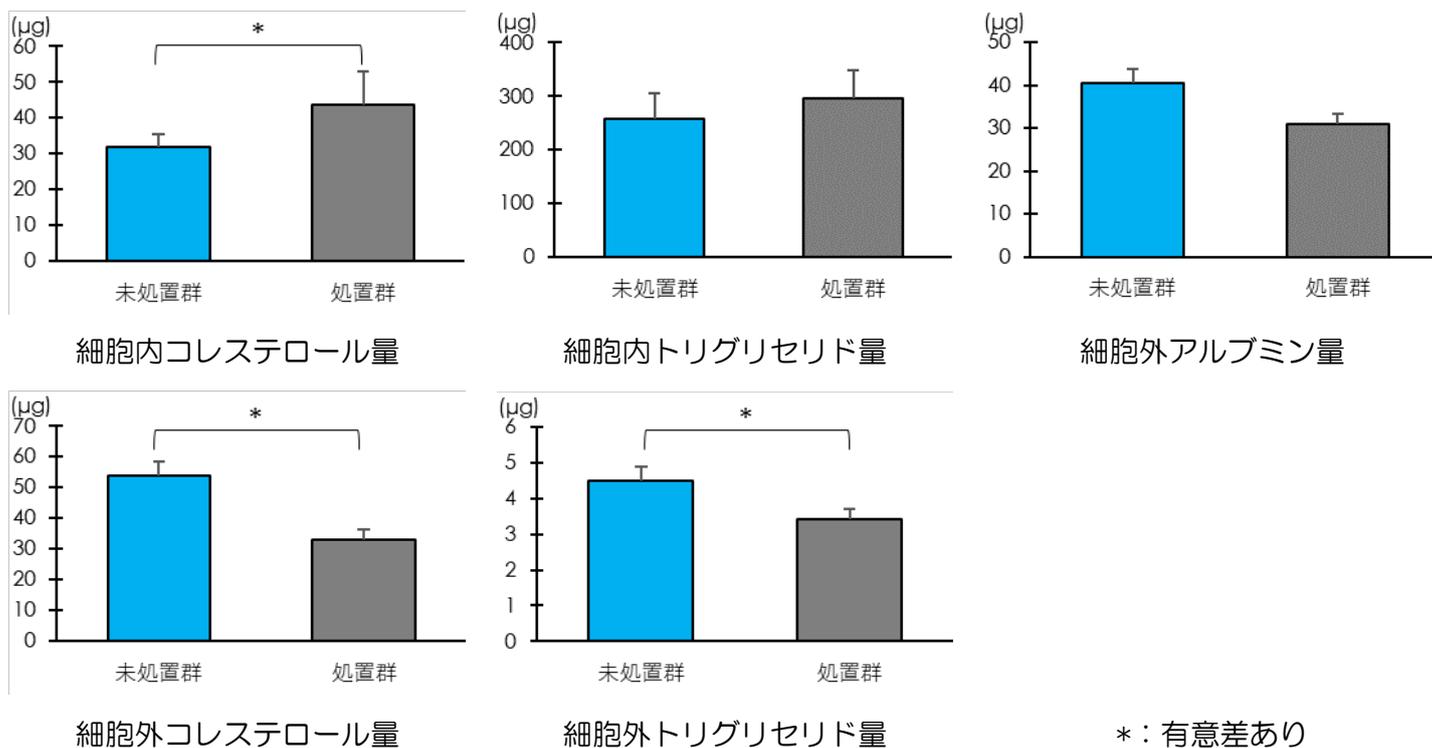


Fig 3 1. ⑬のラクトフェリン (10 µg/mL)

3D PCA Scores Report

Experiment : 20200303
 Active entity list : All Entities
 X-Axis : Component 1 (41.3%)
 Y-Axis : Component 2 (14.63%)
 Z-Axis : Component 3 (9.95%)

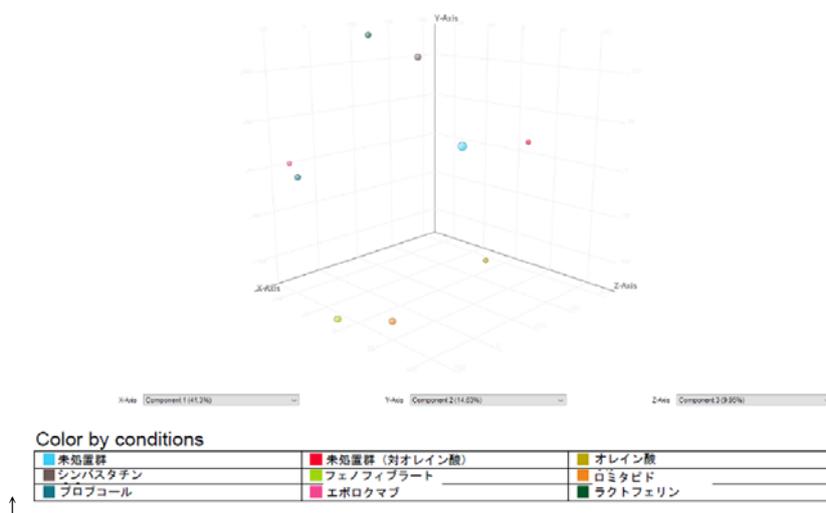


Fig 3 2. ⑬の遺伝子発現 (マイクロアレイ) 解析結果

2-2-3 中括

本節では、2-2 PXB-cells LA の脂質代謝機能確認・調整に係る、PXB-cells LA の脂質合成・分解機能の確認について検討した結果を報告した。PXB-cells LA はヒト肝臓がん由来株化細胞と大きく異なる遺伝子発現パターンを示すことが確認された。また、維持培養期間の長短によっても発現パターンに変化を示すことを確認した。あわせて、PXB-cells は脂肪酸転移反応系のタンパク発現量が高い事を確認した。

また、非臨床・臨床試験において脂質への影響が報告されている大部分の化学物質に対して同様の変化を示す事を再確認した。

2-3 PXB-cells LA のヒト組織類似性の確認

2-3-1 PXB-cells LA とヒト組織由来サンプルの脂質機能の比較

⑭ヒト血清との比較（最終年度）

『⑥維持培養期間の設定及び従来素材との比較』試験により、PXB-cells LA の分泌する脂質が、ヒト肝臓細胞と異なるプロファイルを示すことは確認されたが、このプロファイルがヒト組織由来のサンプルと同じであるかは不明であった。

そこで、ヒト生体内由来のサンプルであるヒト血清中のリポタンパク質プロファイル解析を行い、PXB-cells LA 分泌脂質との比較を行った。ヒト血清は VLDL の他に、HDL、カイロミクロン CM、IDL、及び LDL を含むため、両サンプルの VLDL のピーク位置を評価した。その結果、PXB-cells LA の分泌する VLDL のピークと、ヒト血清中の VLDL のピーク的位置が一致した (Fig 3 3)。このことから、PXB-cells LA が分泌する VLDL はヒト血清の VLDL と同じ分画を示す事が確認された。

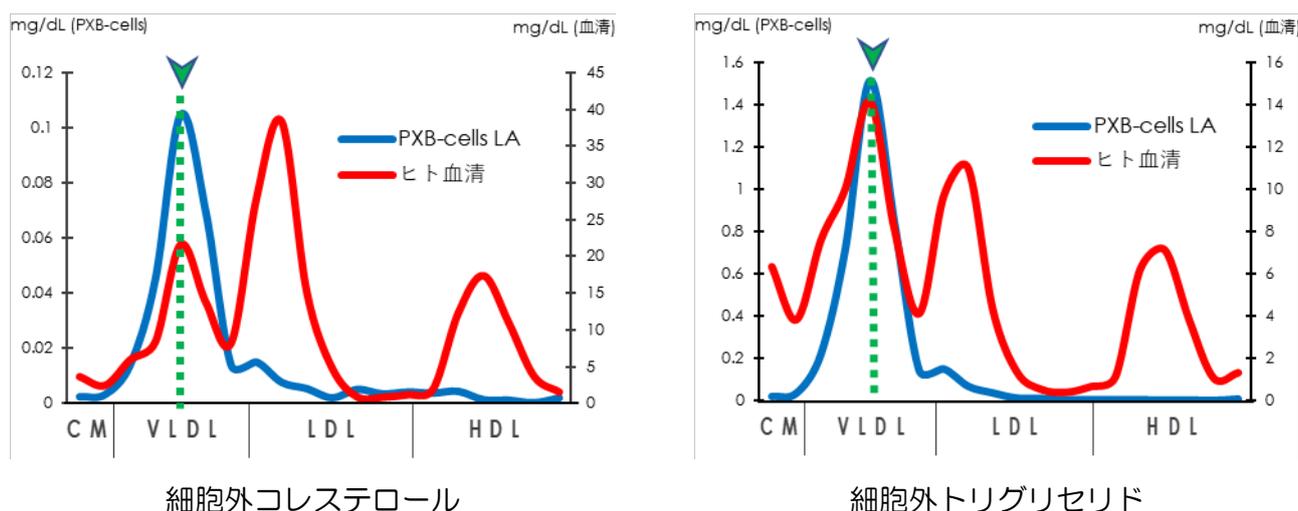


Fig 3 3. ⑭の PXB-cells LA とヒト血清のリポタンパク質プロファイル比較

⑮ヒト非凍結肝細胞との比較（最終年度）

『⑭ヒト血清との比較』試験より、PXB-cells LA はヒト生体内由来に類似の VLDL が分泌

することが示された。次に、ヒト肝臓から分離された新鮮肝細胞（ヒト非凍結肝細胞：FHH）が分泌する脂質との比較を行った。

その結果、PXB-cells LA とヒト非凍結肝細胞のリポタンパク質の構成比及びプロファイルは一致することが示された（Fig 34）。PXB-cells LA のリポタンパク質プロファイルがヒト非凍結肝細胞と一致したことで、PXB-cells LA の脂質代謝機能はヒトに極めて類似していることが示された。

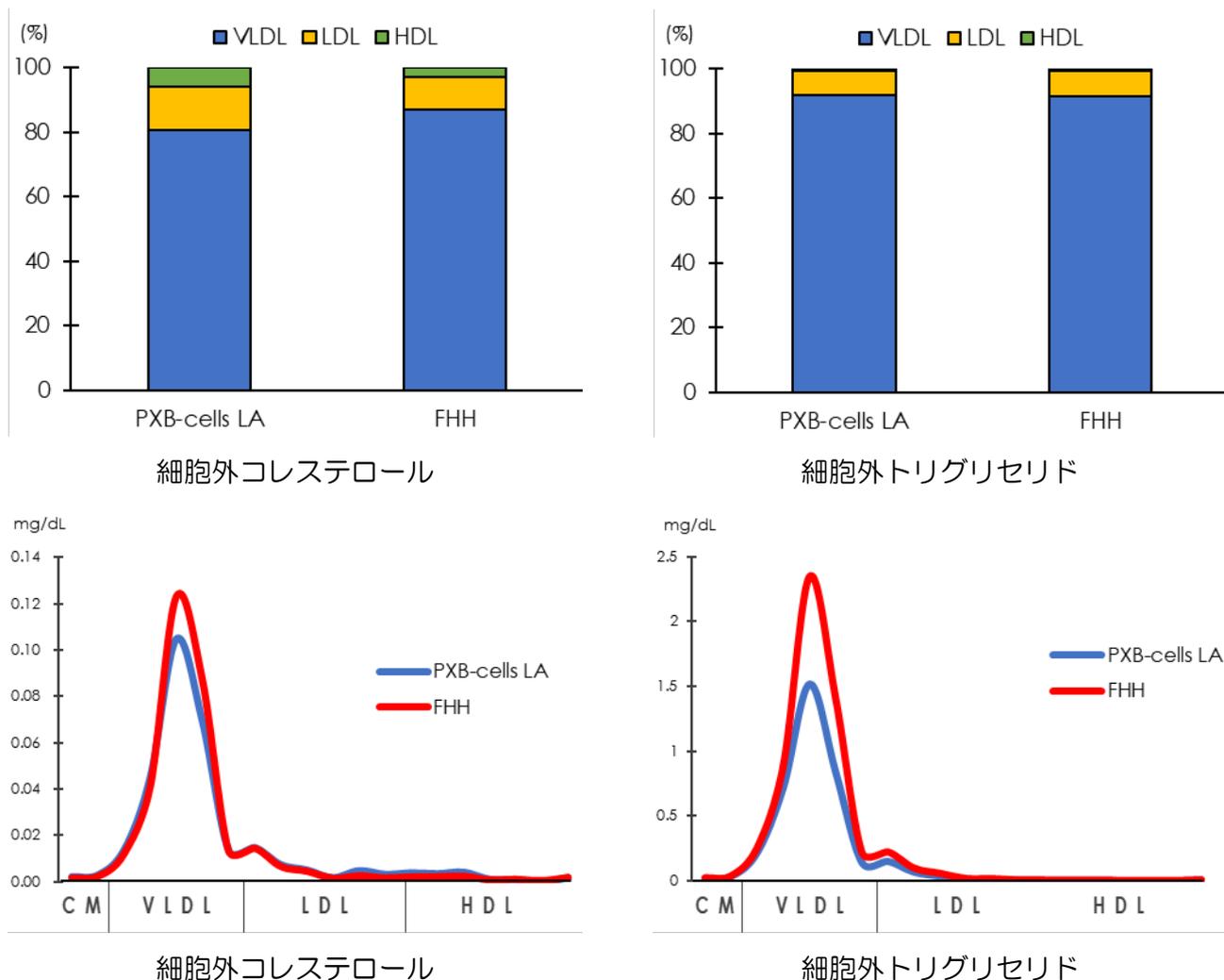


Fig 34. ⑮の細胞外脂質のリポタンパク質構成比較及びPXB-cells LAとFHHのリポタンパク質プロファイル比較

2-3-2 中括

本節では、2-3 PXB-cells LA とヒト組織由来サンプルの脂質機能の比較に係る、ヒト血清及びヒト非凍結肝細胞の脂質の比較について検討した結果を報告した。PXB-cells LA はヒト組織由来サンプルと極めて類似したリポタンパク質プロファイルを有することが確認された。

2-4 販売促進準備・知財関連

2-4-1 対外発信

サポイン事業の研究活動により得られた成果について、対外発信するとともに、新規知見については、特許活動を行った。

⑩学術会議での発表（最終年度）

令和元年12月1～5日に開催された第7回 International Conference on Food Factors (IcoFF) にて、サポイン事業成果の報告をおこなった。

IcoFF は、世界から機能性食品について研究する企業及びアカデミアが一同に会する国際学術会議である。サポイン事業研究において、PXB-cells LA は食品由来の化学物質であるラクトフェリン及びオレイン酸に対しても有効な変化を示す事が確認された。*In Vitro* 分野における機能性食品の脂質代謝への評価には HepG2 などの従来素材が使用されることが多く、それら世界の研究者に対し、PXB-cells LA の有効性を紹介・アピールする場所として最適であると判断した。発表に際して、PXB-cells LA の有効性を詳細に紹介するために、①PXB-cells LA と従来素材との比較、②PXB-cells LA の各化学物質に対する反応性、の2題に分けて行った。また、『2-4-4』にて掲載した PXB-cells LA を紹介するリーフレットを作成し、発表場所に掲示した。

タイトル：PXB-cells[®] for the Study of Lipid Metabolism
Robust and Human-Specific Lipid Profile in Human Hepatocytes Freshly Isolated from Chimeric Mice with Humanized Liver

タイトル：PXB-cells[®] alter lipid metabolism in response to antihyperlipidemic drugs



掲載写真

学術会議に参加していた上場製薬企業1社、上場食品企業1社から、発表中に PXB-cells LA について問い合わせを受けた。将来的な川下企業の候補として期待できる。

⑪学術論文での発表（最終年度）

事業成果について、学術誌 Biomedical Research Tokyo に投稿・採用された。

Biomedical Research Tokyo はオープンアクセスジャーナル形式の英文学術誌であるため、世界の研究者に対し、オンライン上で無料かつ制約無しで閲覧することが可能である。PXB-cells LA の特徴や（従来素材と比較した）アドバンテージについて、詳細に解説することで、製品認知度の向上が期待できる。

Biomedical Research (Tokyo) 41 (1) 00-00, 2020

Lipoprotein profile and lipid metabolism of PXB-cells[®], human primary hepatocytes from liver-humanized mice: proposal of novel *in vitro* system for screening anti-lipidemic drugs

Keishi HATA¹, Sayaka TOMATSU¹, Masaki TAKAHASHI², Akira SASAKI¹, Yui UMEKAWA¹, Kazuya MIYASHITA³, Kazumi OGURA³, Gen TOSHIMA⁴, Masahiro MAEDA^{3,4}, Junichiro TAKAHASHI⁴, and Masakazu KAKUNI²

¹ Akita Research Institute of Food & Brewing, 4-26 Sanuki, Araya-machi, Akita 010-1623, Japan; ² Phoenix Bio Co., Ltd., 3-4-1 Kagamiyama, Higashi-Hiroshima-Shi, Hiroshima 739-0046, Japan; ³ Immuno-Biological Laboratories Co., Ltd., 1091-1 Naka Aza-Higashida, Fujioka-Shi, Gunma 375-0005, Japan; and ⁴ Skylight Biotech Inc., 100-4 Sunada, Iijima-aza, Akita-Shi, Akita 011-0911, Japan

(Received 22 November 2019; and accepted 1 December 2019)

ABSTRACT

We investigated lipid metabolism in PXB-cells, which are human primary hepatocytes isolated from liver-humanized mice, and HepG2 and HuH-7 human hepatoma lines. Lipoprotein levels were higher in PXB-cells than in the 2 other cell lines, and PXB-cells mainly released triglycerides and cholesterol as very low density lipoprotein (VLDL), similar to actual liver tissue, whereas the major lipoprotein released from the 2 hepatoma cell lines was LDL. RT-PCR analysis demonstrated that the gene expression levels of apolipoprotein B100 (ApoB100), the apolipoprotein of VLDL/LDL, were similar in PXB-cells and HepG2 cells, while the overexpression of ApoC2, ApoC3, and ApoE, which are components of VLDL, but not LDL, was observed in PXB-cells. A protein immunoassay revealed that ApoB100 levels secreted from PXB-cells and HuH-7 cells were similar; however, ApoC3 levels were higher in PXB-cells than in the two other cell lines. We also examined the anti-lipidemic activities of fenofibrate using this assay system. Fenofibrate suppressed lipoprotein production from PXB-cells in a dose-dependent manner mainly by activating the β -oxidation pathway. These results suggest that PXB-cells produce high levels of lipoproteins and are suitable for screening anti-lipidemic agents.

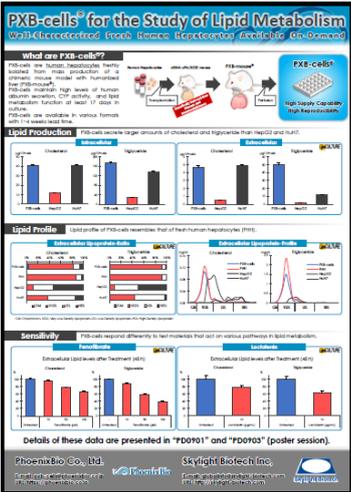
掲載 1 ページ目

タイトル : Lipoprotein profile and lipid metabolism of PXB-cells[®], human normal hepatocytes from liver-humanized mice: proposal of novel *in vitro* system for screening anti-lipidemic drugs

掲載 : Vol. 41, No. 1, p.33-42, 2020

⑩販促準備（最終年度）

PXB-cells LA の取り扱いマニュアルについて、社内・社外用を作成するとともに、パンフレット、リーフレット、及びホームページでの掲載の準備を進めている。

	
<p>マニュアル（仮）</p>	<p>リーフレット（IcoFFにて配布）</p>

2-4-2 中括

サポイン事業研究成果の学術会議発表先として、第7回 IcoFF 及び 2019 American Association for the Study of Liver Disease (AASLD: アメリカ肝臓学会) を予定していたが、IcoFF のみ演題が受理された。AASLD での発表には至らなかったが、同規模で開催される 2020 年 European Association for the Study of the Liver (EASL: 欧州肝臓学会) での発表を予定している。

サポイン事業研究成果の学術論文発表については、予定通り一題の掲載が完了した。

サポイン事業研究により得られた新規知見について、令和元年度内の国内/国際特許申請を完了している。

令和二年度での PxB-cells LA 販売のために、商品に関するリーフレットやマニュアルについて準備を進めている。

最終章 結論

3-1 研究開発成果の総括

2年間の研究で予定されていた、PXB-cells LAの基本的生産方法及び取り扱い方法の確立、2. PXB-cells LAの脂質代謝機能確認・調整、及び本事業のアドバイザーより提案のあった、ヒト組織由来サンプルの脂質機能の比較に関する研究についてすべて完了させた。

これらの研究から、脂質代謝機能を維持しながらPXB-cells LAを安定的に供給する培養方法が確立された。また、PXB-cells LAは従来素材と異なり、ヒト本来の脂質代謝機能とほぼ同等の性質を有しながら、医薬品/食品分野における各種化学物質の脂質代謝への影響を評価可能な素材であることが証明された。

3-2 補助事業終了後の技術課題

3-2-1 PXB マウス 異ドナー間の脂質代謝機能差についての評価

PXB マウスの社内研究において、移植するヒト肝細胞ドナーによって、PXB マウスの肝機能が変化することが確認されている。

今後、異なるドナー由来のPXB-cell LAについて、脂質代謝機能を評価するとともに、解析を進める。

3-2-2 PXB-cells LAの一部化学物質への影響の再評価

『2-2-2-2 本試験』にて、変化が確認されなかった一部の化学物質（プロブコール・エボロクマブ）について、化学物質のメカニズムをより理解することで試験方法を見直し、再解析を進める。

3-2-3 PXB-cells LAのマイクロアレイ解析の深化

2年間の研究で得られたマイクロアレイデータについて、一部の解析は完了したが、データ量が膨大であるため、PXB-cells LAの脂質代謝機能の理解を深めるために、さらなる解析を進める。

3-3 事業展開について

PXB-cells LAは、令和2年度中に販売開始を予定している。

販売開始初期は、学術活動においてコンタクトを持ったエンドユーザーに対して優先的に商品紹介を行う。また、株式会社フェニックスバイオの既存のエンドユーザーに対しても商品紹介を進めていく。エンドユーザーの確保については、上記の個別対応に加え、販売代理店候補とも交渉を進めている。これらの活動によるエンドユーザーの対象は、国内外の食品系企業・研究者、及び製薬系企業・研究者である。

次に、PXB-cells LAを利用する脂質代謝分析業務の実施については、先ず株式会社フェニックスバイオにおいて細胞培養及び試料採取の実施体制確立を進めており、これによりエン

ドユーザーからのクレームに対応できる体制とする。並行してこの商品に興味を持つ受託試験実施機関との交渉を進めており、当該受託試験実施機関では既に脂質代謝を研究しているエンドユーザーを持っていることから、営業と細胞培養及び試料採取の全てが完結できる見込みである。

PXB-cells LA の供給体制は、現在は株式会社フェニックスバイオの本社施設に加え、カナダ エドモントン州の KMT Hepatech 社（子会社）への移管を予定している。

最後に、PXB-cells LA の有用性・商品性を向上させるために、PXB-cells LA と組み合わせる脂質分析方法の発展・充実も重要である。そのため、当事業に参加いただいた秋田県総合食品研究センターや、当事業において脂質分析を委託したスカイライト・バイオテック株式会社との連携を今後も維持し、分析方法の発展・充実に努める。

3-4 その他補助事業の成果に係る発表、報道など

学術会議（発表予定）

①2020 EASL 2020 International Liver Congress（欧州肝臓学会議：ロンドン、英国）
令和2年8月25～28日

②第74回日本栄養・食糧学会大会（仙台、宮城）

令和2年5月15～17日（新型コロナウイルス感染拡大のため中止、学会大会誌への要旨掲載のみ）

③第27回 HAB（Human Animal Bridging）研究機構学術年会（東京、東京）

令和2年9月3～5日