

博士論文

ヒト肝細胞の三次元培養による 機能発現メカニズムに関する研究

平成 28 年度

崇城大学大学院 工学研究科

応用生命科学専攻 博士後期課程

医用生体工学講座

1419D02

水民 敬浩

目次

第1章 緒論	1
第2章 培養担体 Cellbed [®] で三次元培養させた成人肝細胞の Genopal [®] customized Hepatocyte chip を用いた遺伝子発現解析	
2-1 序	8
2-2 実験方法	
2-2-1 使用細胞、使用試薬、器具及び機器	12
2-2-2 試薬の調製法	15
2-2-3 滅菌法	18
2-2-4 細胞の計数法	19
2-2-5 細胞の融解法及び凍結法	19
2-2-6 細胞の継代法	21
2-2-7 Cellbed [®] の作製方法および特徴	22
2-2-8 Cellbed [®] の実験前処理及び成人肝細胞の培養	23
2-2-9 走査型電子顕微鏡(SEM)による細胞及び Cellbed [®] の観察	24
2-2-10 細胞の RNA 精製	27
2-2-11 Genopal [®] customized Hepatocyte chip の作製方法及び特徴	28
2-2-12 Genopal [®] customized Hepatocyte chip を用いた遺伝子解析	29
2-3 結果と考察	
2-3-1 Genopal [®] customized Hepatocyte chip 搭載遺伝子内訳	30
2-3-2 同条件での各細胞の scatter plot	32
2-3-3 培養終了後の SEM による成人肝細胞の形態観察	35
2-3-4 各培養条件での成人肝細胞の遺伝子解析	36
2-4 総括	38
第3章 spheroid 培養を用いて三次元培養させた HepG2 細胞の薬剤耐性現象の解析	
3-1 序	39
3-2 実験方法	
3-2-1 使用細胞、使用試薬、器具及び機器	42
3-2-2 試薬の調製法	43
3-2-3 滅菌法	44
3-2-4 細胞の計数法	44
3-2-5 細胞の融解法及び凍結法	45
3-2-6 細胞の継代法	46

3-2-7	spheroid 培養法 (poly-L-glutamic acid による被覆方法)	47
3-2-8	HIF-1 α の免疫染色法	48
3-2-9	HIF-1 α のウエスタンブロット法	51
3-2-10	MDR1 の免疫染色法	56
3-2-11	細胞の RNA 精製	57
3-2-12	Genopal [®] customized Hepatocyte chip の作製方法及び特徴	57
3-2-13	Genopal [®] customized Hepatocyte chip を用いた遺伝子解析	57
3-3	結果と考察	
3-3-1	HepG2 細胞の HIF-1 α の共焦点レーザー顕微鏡観察	58
3-3-2	ウエスタンブロットによる HIF-1 α の発現	59
3-3-3	HepG2 細胞の MDR1 の共焦点レーザー顕微鏡観察	61
3-3-4	各培養条件での HepG2 細胞の遺伝子解析	62
3-4	総括	63

第 4 章 培養担体 Cellbed[®]を用いて三次元培養させた HepG2 細胞の薬剤耐性現象の解析

4-1	序	65
4-2	実験方法	
4-2-1	使用細胞、使用試薬、器具及び機器	67
4-2-2	試薬の調製法	67
4-2-3	滅菌法	67
4-2-4	細胞の計数法	67
4-2-5	細胞の融解法及び凍結法	67
4-2-6	細胞の継代法	68
4-2-7	Cellbed [®] の作製方法及び特徴	68
4-2-8	Cellbed [®] の実験前処理及び HepG2 細胞の培養	68
4-2-9	走査型電子顕微鏡(SEM)による細胞及び Cellbed [®] の観察	68
4-2-10	アクチン及び核の二重染色法	69
4-2-11	DOX の 50%増殖抑制試験(IC ₅₀ 値の測定)	70
4-2-12	HIF-1 α の免疫染色法	74
4-2-13	HIF-1 α のウエスタンブロット法	75
4-2-14	MDR1 の免疫染色法	76
4-2-13	細胞の RNA 精製	77
4-2-14	Genopal [®] customized Hepatocyte chip の作製方法及び特徴	77
4-2-15	Genopal [®] customized Hepatocyte chip を用いた遺伝子解析	77
4-3	結果と考察	
4-3-1	培養終了後の SEM による形態観察	78
4-3-2	HepG2 細胞のアクチン及び核の共焦点レーザー顕微鏡観察	79

4-3-3	Cellbed®培養を用いた HepG2 細胞に対する 50%増殖抑制試験(IC ₅₀ 値)	80
4-3-4	HepG2 細胞の HIF-1 α の共焦点レーザー顕微鏡観察	81
4-3-5	ウエスタンブロットによる HIF-1 α の発現	82
4-3-6	HepG2 細胞の MDR1 の共焦点レーザー顕微鏡観察	84
4-3-7	同条件での HepG2 細胞の scatter plot 解析	85
4-3-8	各培養条件での HepG2 細胞の遺伝子解析	87
4-4	総	88
第 5 章 総論		90
参考文献		94
謝辞		99

第1章 緒論

がんは1981年以降、日本での死亡原因として第一位を占めており、既存の治療法の効果が限定的であることから、より有効な新規治療薬の開発が望まれている。

新規の抗がん剤の開発から許認可にはいくつかの段階があり、1991年2月、抗悪性腫瘍薬の臨床評価方法に関するガイドラインが厚生省(現：厚生労働省)より通知された¹⁾。これは国際的協調を主眼点として各種の薬剤の評価法を国際間でなるべく共通させようとする動きの中から生まれたもので、これ以降開発される抗がん剤については、このガイドラインに則った評価が行われている。このガイドラインは、通知以降に開発された抗体治療薬や分子標的薬などの薬剤、また海外の試験により有用性が認められた薬剤を早期に導入するための規制緩和などの意見もあり2005年11月に改訂が行われている²⁾。これらはヒトの臨床試験、治験についてのガイドラインであり新しい医薬品の研究、開発にはさらにその前段階として薬剤のスクリーニングなどの試験や、薬理研究、製剤化研究、毒性研究などの基礎試験(前臨床試験)を経る必要がある。前臨床試験については2010年6月、抗悪性腫瘍薬の非臨床評価に関するガイドラインが厚生労働省から通知された³⁾。このガイドラインは、進行がんで治療方法の選択肢が限られた患者の治療を目的として臨床試験を行う抗がん剤の開発にあたって必要となる前臨床試験についての指針が示されている。このガイドライン中での前臨床試験を行う目的として、医薬品の薬理学的特性を明らかにすること、初めてヒトに投与する際の安全な初回投与量を確立すること、医薬品の毒性プロファイルを明らかにすることを挙げており、また、前臨床試験に用いる実験動物は3R(使用動物数の削減・実験動物の苦痛軽減・代替法の利用)⁴⁾(Fig. 1-1)の原則に従い不必要な使用を避けることが述べられている³⁾。

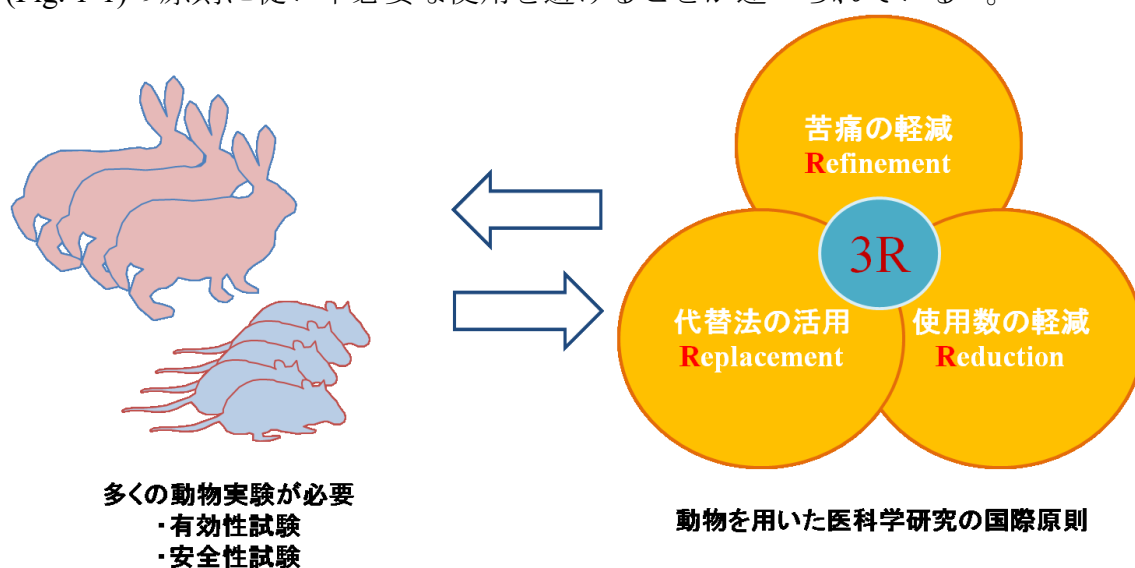


Fig. 1-1 動物を用いた医科学研究の国際原則 3R⁴⁾

しかしながら、抗がん剤の開発を促進させ、かつ患者を不必要な副作用から守るために、実際の前臨床試験では多数の実験動物が犠牲となっている。1985年に、国際医科学連合 Council for International Organizations of Medical Sciences : CIOMS が 3R 原則を 11 か条に具体化し、世界各国が 3R 原則をさまざまな形で動物実験に反映させている。動物福祉の観点から国際的に出来得る限り代替試験法に移行するガイドラインが我が国にもできつつあり、抗がん剤の開発においても 3R の原則に則って研究することが望まれている。また、抗がん剤の開発にあたっては、その薬剤が臨床上ヒトのがんに有効か否かをあらかじめ十分に推定しうる成績が必要である。そのため、抗がん剤開発のためのスクリーニングにおいては、*in vitro* でいかに *in vivo* を正確に模倣できるかが重要であると言える。これらを踏まえ、開発の初期における薬剤のスクリーニングは極めて重要な意味を持つ。

現在の化学療法において、がん細胞の内因性あるいは後天性の薬剤耐性、特に多剤耐性(Multidrug Resistance:MDR)は、固形がんの治療において、大きな問題の一つとなっている⁵⁾。多剤耐性は、がん患者の肝臓における制がん剤の不活化や代謝亢進などの生体反応に原因がある場合と、がん細胞レベルでの生化学的変化に原因がある場合がある。中でも、がん細胞レベルの生化学的な耐性メカニズム⁶⁾としては、薬剤排出活性の亢進、標的酵素やタンパク質の増幅^{7,8)}、薬剤活性化機構や酵素活性の低下⁹⁾、障害修復機構¹⁰⁾、制がん剤不活化機構の亢進¹¹⁻¹³⁾の 5 つが考えられている。これらの薬剤耐性メカニズムの中で、薬剤排出活性の亢進、特に MDR1 タンパク質による薬剤排出の研究が多く報告されており、がんの多剤耐性は、P 糖タンパク質(P-gp; MDR1)や MDR-associated protein(MRP)のような薬剤排出タンパク質によって、がん細胞内から細胞外への薬剤の排出が活性化されることに関連して引き起こされている¹⁴⁾。また、MDR1 は、ATP-binding cassette(ABC)トランスポータータンパク質ファミリーの一種であり、ATPase 活性を有し^{15,16)}、ATP を加水分解することにより構造変化を起こし、抗がん剤に対し高親和性となり抗がん剤を細胞外に膜輸送している ATP 依存性ポンプである¹⁷⁻²⁰⁾。現在、薬剤排出活性タンパク質である MDR1 によって細胞外へ排出される薬剤は、ドキソルビシン(DOX)などのアントラサイクリン系制がん剤、ビンクリスチンなどのビンカルカロイド系制がん剤、エトポシドなどのポドフィロトキシン誘導体やタキソールなどの制がん剤が報告されている¹¹⁾。

このような薬剤排出の克服は、がん治療の大きな課題となっており⁵⁾、1981年に鶴尾らによってカルシウム拮抗薬である verapamil が多剤耐性を克服することが報告されている²¹⁾。その後、他のカルシウム拮抗薬、カルモジュリン阻害剤などが同様に耐性克服作用をもつことが明らかになった²²⁻²⁶⁾。これらの薬剤はがん細胞において亢進した抗がん剤の排出を阻害する。その結果、細胞内の抗がん剤濃度が高

まり、耐性細胞は死滅する。特に verapamil はがん細胞において MDR1 に直接作用し、その機能を阻害していることが明らかとなっている²⁷⁾。しかしながら、これらの阻害剤はそれ自身が薬剤であるため、副作用を引き起こす可能性が考えられる。そのため、副作用は示さず、MDR1 による薬剤排出活性を抑制し、薬剤耐性を克服する阻害剤が望まれている。

また、近年、このがん細胞による薬剤排出活性の亢進に、三次元組織形成が関与していることが報告され²⁸⁾、細胞の三次元化と薬剤耐性の関連について注目されている。特に、MDR1 は、がん組織内が低酸素状態になることによって、低酸素誘導性転写因子(hypoxia-inducible factor : HIF-1) が応答することで、発現が亢進することが報告されている²⁹⁻³³⁾。HIF-1 は、1992 年に Semenza らによって低酸素依存的にエリスロポエチン(EPO)を誘導する因子として発見された³⁴⁾。そして 1995 年に HIF-1 が HIF-1 α と HIF-1 β のヘテロダイマーであり、それぞれ 826 個(分子の質量 120kDa)および 789 個(分子の質量 91~94kDa)のアミノ酸からなっていることが報告され³⁵⁾、同年に各遺伝子がクローニングされた³⁶⁾。HIF-1 α にはアイソフォームとして HIF-2 α および HIF-3 α 1~6 が同定されているが^{37,38)}、これらのアイソフォームの組織分布や機能は HIF-1 α と異なっている^{39,40)}。HIF-2 α は、HIF-1 α と同様に低酸素条件下において HIF-1 β と結合し、標的遺伝子の転写を促進している^{38,41)}。それに対し HIF-3 α は、HIF-1 α や HIF-2 α と競合することで、その転写活性を抑制することが報告されている^{42,43)}。

また、HIF-1 の発現ならびに活性制御機構としては、主として HIF-1 α によって酸素濃度依存的に、HIF-1 β によって酸素濃度非依存的に HIF-1 の転写活性に影響が及ぼされている^{44,45)}。この HIF-1 α の発現及び活性の制御機構は非常に複雑で、酸素濃度依存的のみならず Epidermal growth factor(EGF)や Insulin growth factor-1/2 (IGF-1/2)などの増殖因子、サイトカインによっても影響され、HIF-1 α 自身の転写、翻訳、および翻訳後レベルで調節されていることが明らかとなっており⁴⁶⁻⁴⁸⁾、さらに AP-1、AP-2、NF-1 および NF- κ B などの転写因子もまたその転写活性に関与していることが報告されている⁴⁷⁾。しかし、通常酸素条件下において HIF-1 α は不安定で HIF-1 の安定化と機能の制御は、翻訳後修飾、プロリン及びアスパラギン残基の水酸化、リジン残基のアセチル化、およびリン酸化などによって調節される。

各 HIF- α サブユニットには oxygen-dependent degradation(ODD)ドメインと呼ばれる領域が存在し、タンパク質の安定性制御を担っている。プロリン残基の水酸化による調節においては、この領域に含まれる二つのプロリン残基(Pro402 および Pro564)が、酸素や Fe²⁺、 α -ケトグルタル酸、アスコルビン酸を補因子として要求する prolyl hydroxylase domain(PHD)により水酸化修飾を受ける。その結果、HIF-1 α は von Hippel-Lindau (VHL)病の原因遺伝子である pVHL 蛋白質と結合することによ

リユビキチン化され、プロテアソーム依存的に分解される^{49,50})。そのため、低酸素条件下においては PHD の酵素活性は抑制され、その結果、HIF-1 α と pVHL との結合が生じず、HIF-1 α は分解されずに核に移行し、HIF-1 β と結合して転写活性を示すようになる。

アスパラギン残基の水酸化においては、PHD と同様に通常酸素条件下で活性に酸素を要求するアスパラギン残基 (Asn803) が Factor inhibiting HIF-1 (FIH)によって水酸化修飾を受けるため、転写共役因子であるヒストンアセチル基転移酵素 CREB-binding protein(CBP)/p300 との結合阻害を介して HIF-1 の転写活性は抑制される⁵¹)。

また、リジン残基のアセチル化による調節では、HIF-1 α の ODD 内のリジン残基 (Lys532)が Arrest-defective-1(ARD1)によってアセチル化され、HIF-1 α と pVHL との結合が増強し、HIF-1 α のプロテアソーム依存的分解が促進される⁵²)。ARD1 は PHD と異なり酸素依存的ではないが、低酸素条件下では ARD1 の mRNA および蛋白質の発現レベルが低下するため HIF-1 α は安定化する。

リン酸化による調節では、HIF-1 α の転写活性に関わる C-terminal transactivation domain (C-TAD)を MAP キナーゼがリン酸化することによって転写活性が上昇する。MAP キナーゼの1つである ERK1/2 は、CBP/p300 をリン酸化することにより HIF-1 の転写活性を増強させ⁵³)、p38MAP キナーゼも HIF-1 α をリン酸化することにより pVHL との結合やプロテアソーム依存的分解を抑制し、発現を高めることが報告されている^{54,55})。

以上のように、PHD や FIH-1 の酸素要求性に依存したメカニズムによって、HIF-1 α タンパク質は恒常的に生合成されているにもかかわらず、通常酸素条件下では HIF の転写活性は低く抑えられている。

転写因子である HIF-1 はプロモーター領域に存在する Hypoxia-responsive element (HRE) に結合することにより転写を誘導することが知られており⁵⁶⁾、HRE を有する HIF-1 の標的遺伝子としては、EPO や Vascular endothelial growth factor (VEGF) などこれまで 60 以上の遺伝子が明らかにされている (Fig. 1-2)⁵⁷⁻⁶⁰⁾。これらの遺伝子の機能の調節に HIF-1 が関係しており、例えばエネルギー代謝に関して、通常酸素条件下にある細胞は、解糖系とミトコンドリアが担う酸化的リン酸化によって 1 分子のグルコースから 38 分子の ATP を産生する。一方、低酸素条件下では効率よく ATP を産生することはできないながらも、嫌氣的解糖系によって 1 分子のグルコースから 2 分子の ATP を産生することができる。このように低酸素条件にさらされた細胞は HIF-1 を活性化することで嫌氣的解糖系を亢進し、ATP を産生することが明らかになっており、HIF-1 による解糖系の活性化機構としては、glucose transporter1 (GLUT1) の発現誘導によってグルコースの取り込みを上昇させることが知られている⁶¹⁾。また血管新生に関して、HIF-1 は VEGF や platelet-derived growth factor beta polypeptide (PDGFB)、さらに basic fibroblast growth factor (bFGF) などの発現を誘導し、血管形成を亢進させ、最終的に酸素環境を改善する作用も持つ⁶²⁾。このようなエネルギー代謝、血管新生、浸潤、転移、細胞骨格、転写、物質輸送、細胞増殖、アポトーシスなど様々な機能の調節に HIF-1 は重要な役割を持つ。

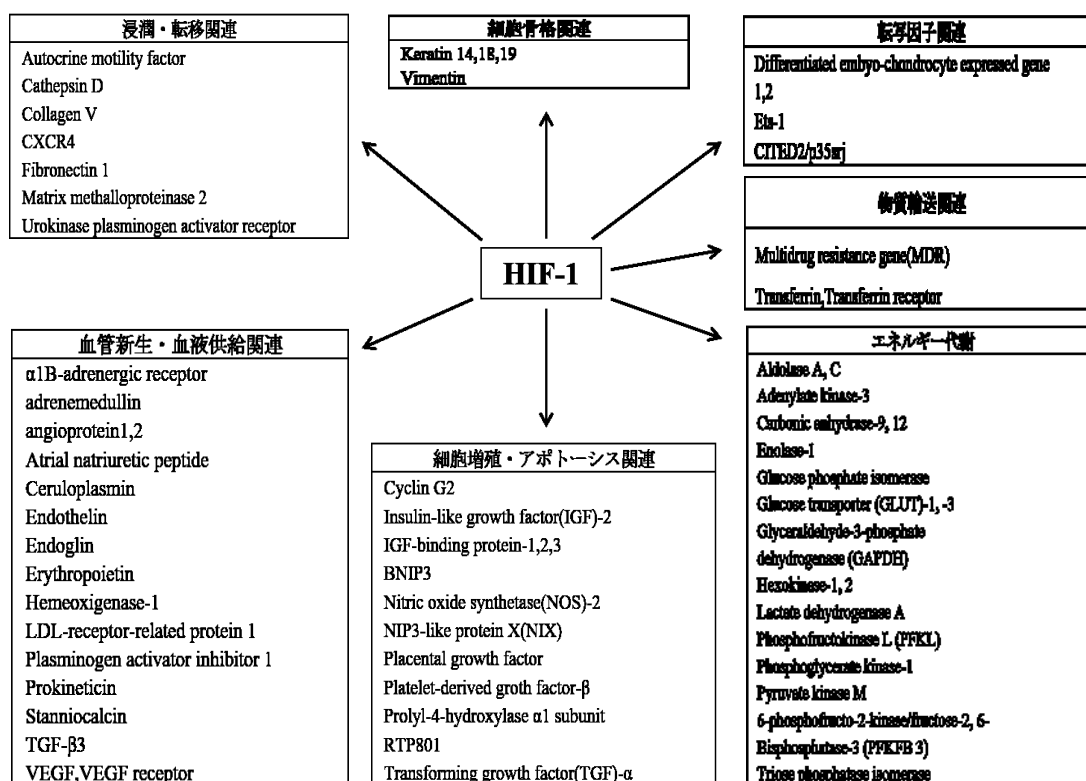


Fig. 1-2 HIF-1 によって調節される遺伝子群⁶⁰⁾

前述した通り、HIF-1 はがん研究においても注目を集められており、通常の細胞と同様に、エネルギー代謝や血管新生を介してがん細胞の低酸素に対する適応に関与している⁶³⁾。また、通常酸素条件下でも解糖系を用いて ATP を産生しているがん細胞の Warburg 効果⁶⁴⁾においても HIF-1 が関わっていることが明らかにされつつある。

固形がんの組織においては、がん細胞が非常に早い速度で増殖するのに対して、腫瘍内部の血管形成速度は遅く、腫瘍血管は頻りに閉塞や血液の逆流を引き起こす。その結果、腫瘍組織には十分な酸素が供給されない低酸素領域が生じ、HIF-1 が活性化することが報告されており⁶⁵⁾、HIF-1 は十分な血流が得られない低酸素、低栄養状態にあるがん組織において、がん細胞を変化させ、低酸素、低栄養状態に適応していることも明らかとなっている^{66,67)}。

また、HIF-1 はがん細胞の環境適応のみならず、転移にも関与していることが明らかになっており、がん細胞において上皮間葉転換(EMT)を制御する転写因子 Twist の発現を誘導し、TGF- β と協調して Smad 経路の活性化などを介して EMT を引き起こすことも報告されている⁶⁸⁾。

加えて、低酸素や HIF-1 は様々な治療に対する抵抗性とも関係している。例えば、HIF-1 が活性化することによって、薬剤の細胞外排出に関わる MDR1 の発現が誘導され抗がん剤の細胞外への排出を促進することや⁶⁹⁾、細胞増殖依存的な薬剤に対する抵抗性を獲得すること⁷⁰⁾、また、放射線に対し抵抗性を示すこと⁷¹⁾が知られている。

以上のことより HIF-1 はがん細胞において様々な標的遺伝子の発現誘導を介して生存シグナル等の活性化を行っているが、その作用は生存、増殖のみならず、浸潤、転移、薬剤耐性に関わる MDR1 などに関与しているため今後のがんの治療において非常に重要なターゲットであるといえる。

これまで本研究室では、三次元培養技術として、正常肝細胞の機能発現と維持のための三次元培養(spheroid 培養)について検討を行ってきた⁷²⁾。spheroid 培養は、細胞を三次元の球状細胞集塊として培養する方法で、プロテオグリカン等の細胞外マトリックスを用いた培養法⁷³⁾、ポリウレタンフォームを用いた培養法⁷⁴⁻⁷⁶⁾、陽性荷電ディッシュを用いた培養法^{77,78)}などが知られている。さらに、肝細胞を spheroid 培養することで、細胞集塊内に胆管様構造が形成されるなど、生体内に近い組織構造の形成を伴っている事が知られている⁷³⁾。実際の生体内の肝細胞は、互いに三次元的に接触して組織を形成しているが、これをバラバラに単離した肝細胞や、dish 上などで肝細胞が二次元的に伸展した二次元単層培養(monolayer 培養)では、機能の維持が数日と十分ではない。しかし、肝細胞を人工的に三次元培養して spheroid を作ることにより、一部組織化が起これ、実際の肝臓に近い状態となり、

機能が数週間～1ヶ月と長期持続することが報告されている⁷⁹⁾。

また、本研究室博士課程修了生の押方氏の実験で、肝がん細胞(HepG2細胞)の spheroid 培養法を用いて、モデル薬物として実際に臨床で使用されている制がん剤であるドキソルビシン(DOX)を用い、HepG2細胞の薬剤耐性の原因の一つである細胞の高い排出活性とMDR1タンパクを生体外で発現させることに成功している⁸⁰⁾。

現在、本研究室の spheroid 培養以外にも、細胞シートなどの細胞積層化技術、磁力を用いた細胞の三次元組織化、細胞を1層ずつ積み重ねる積層法や集積法、3Dバイオプリンターなどの三次元培養法が確立されており⁸¹⁾、各メーカーから様々な三次元培養基材が開発されている。

本研究では、本研究室の spheroid 培養に加え、細胞積層技術の培養方法を用いた日本バイリーン株の培養基材 Cellbed[®]を使用した。Cellbed[®]は高純度のシリカファイバーからなる三次元培養担体を用いることで、細胞間相互作用を妨げない極細繊維と繊維間距離を持ち、均一性の高い積層シート状の培養形態から均一な細胞層を形成することができる培養基材⁸²⁾であるため、薬剤耐性を生体外で発現することができる可能性がある。以上の Cellbed[®]及び spheroid 培養法を用いて成人肝細胞及び HepG2 細胞を *in vitro* で三次元培養し、遺伝子や薬剤耐性についての検討を行った。また、細胞の三次元形成に伴う遺伝子発現の変化を追うために、三菱レイヨン株との共同で、DNAチップ Genopal^{®83)}に肝臓細胞に関する遺伝子のプローブを搭載した肝臓細胞チップ(Genopal[®] customized Hepatocyte chip)を開発し、これを用いて解析を行った。

本論文は5章から構成されている。第2章では、成人肝細胞(初代ヒト凍結肝細胞)を培養基材 Cellbed[®]を Genopal[®] customized Hepatocyte chip で解析を行った。第3章では、本研究室の spheroid 培養を用いて、HepG2細胞の薬剤耐性に関わる HIF-1 α 及び MDR1 の発現や、Genopal[®] customized Hepatocyte chip を用いて遺伝子発現を解析した。第4章では、HepG2細胞を培養基材 Cellbed[®]で三次元培養し、DOX や verapamil を用いて薬剤耐性の発現を検討した。また、第3章と同様に薬剤耐性に関わる HIF-1 α 及び MDR1 の発現や、Genopal[®] customized Hepatocyte chip を用いて遺伝子発現を解析した。第5章は以上の研究の総論である。

第 2 章 培養担体 Cellbed[®]で三次元培養させた成人肝細胞の Genopal[®] customized Hepatocyte chip を用いた遺伝子発現解析

2-1 序

現在、医薬品開発の前臨床試験における化学物質等の安全性評価は、実験動物を用いる試験法を中心に標準化されている。しかし、ヒトとその他の動物では存在する酵素の分子種及びその他の遺伝子に違いがあるため、前臨床から臨床試験に移行する際に脱落する候補医薬品の割合が多いのが問題となっている⁸⁴⁾。そのため、前臨床試験の前の段階で、できるだけ生体内の環境に近い形でヒトの細胞を用いた評価系の確立が必要となっている⁸⁵⁾。

医薬品の代謝の中心臓器が肝臓であるため、現在これらの評価系には、成人肝細胞(初代ヒト凍結肝細胞)が用いられているが、ドナー間の個人差が生じることや海外からの輸入に頼っているため供給が安定しておらず、さらに生体外では短期間で機能を失ってしまうという問題が挙げられている⁸⁶⁾。

また、成人肝細胞は生体外では増殖せず、通常の単層培養では培養 2、3 日で機能の低下や消失が起こるため、急性毒性試験のみの検討しか行えない。しかしながら、成人肝細胞の機能を長期維持することができれば試験期間がより長い亜急性毒性試験(2 週間以上)、亜慢性毒性試験、慢性毒性試験において利用可能となる。そのため、成人肝細胞の機能を生体外で長期間再現する技術の開発は、動物実験の代替法を始め様々な分野で期待されている⁸⁷⁻⁸⁹⁾。

本研究室博士課程修了生の石井氏の実験で、Cellbed[®]を用いて、成人肝細胞の長期機能維持を目的として Alamar Blue 法による生細胞数の測定、CYP3A4 活性測定、GOT、GPT 漏出量測定が行われている。

Cellbed[®]は、高純度のシリカファイバーからなる三次元培養担体を用いることで細胞間相互作用を妨げない極細繊維と繊維間距離を持ち、均一性の高い積層シート状の培養形態から一定の細胞層を形成することが可能である。また、Cellbed[®]培養は多孔性三次元培養プラットフォームに分類される培養形態で、均一性の高い細胞層を形成し、安定性が高く非常に取り扱いが簡便であるため、容易に三次元培養が可能である。

それらの実験により成人肝細胞の monolayer 培養と Cellbed[®]培養において、生存率が高くなる傾向が見られ(Fig. 2-1)、肝障害の指標である GOT、GPT の漏出量については、monolayer 培養では 10 日目以降に増加するのに対し Cellbed[®]培養ではそれが見られず、成人肝細胞への障害が少ない状態で培養できる可能性が示された(Fig. 2-2, 2-3)。CYP3A4 活性では、培養 4 日目にはどの培養条件でも大きな差は見られなかったが、培養 16 日目では、monolayer 培養に

比べ Cellbed®培養したもので有意に活性値の上昇が見られた(Fig. 2-4)。これらの結果より、生存率、薬物代謝活性、細胞障害の観点から成人肝細胞の長期培養において Cellbed®は非常に有用であるものと示唆された⁹⁰⁾。

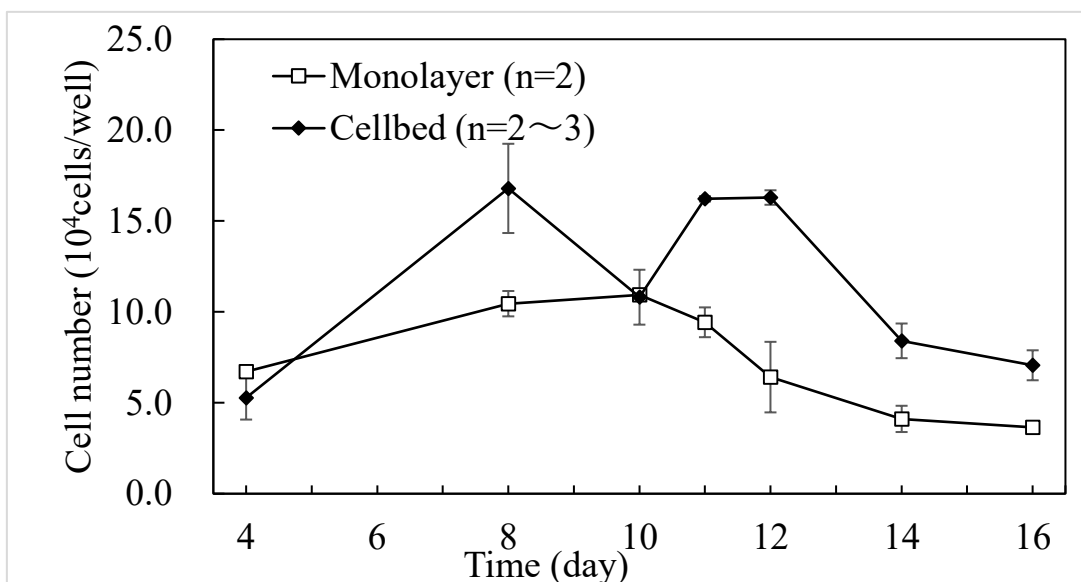


Fig. 2-1 各培養条件での成人肝細胞の細胞密度の推移⁹⁰⁾

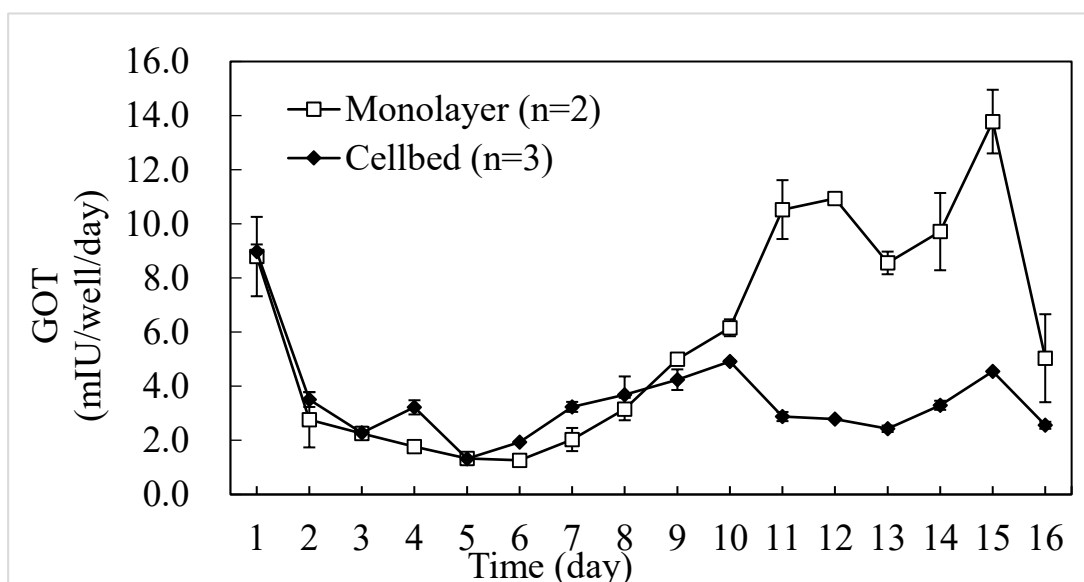


Fig. 2-2 各培養条件での GOT 漏出量⁹⁰⁾

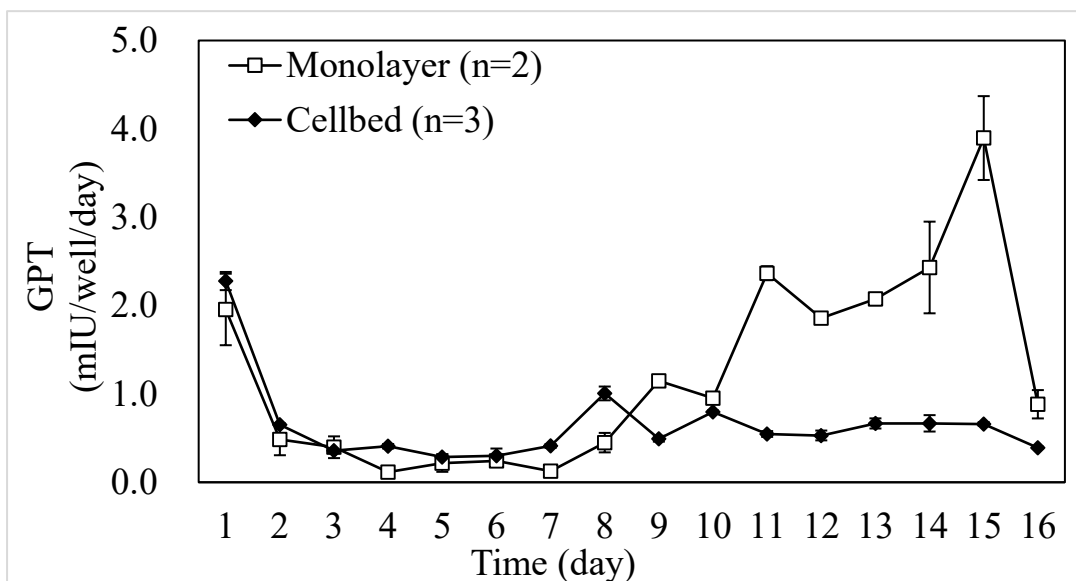


Fig. 2-3 各培養条件での GPT 漏出量⁹⁰⁾

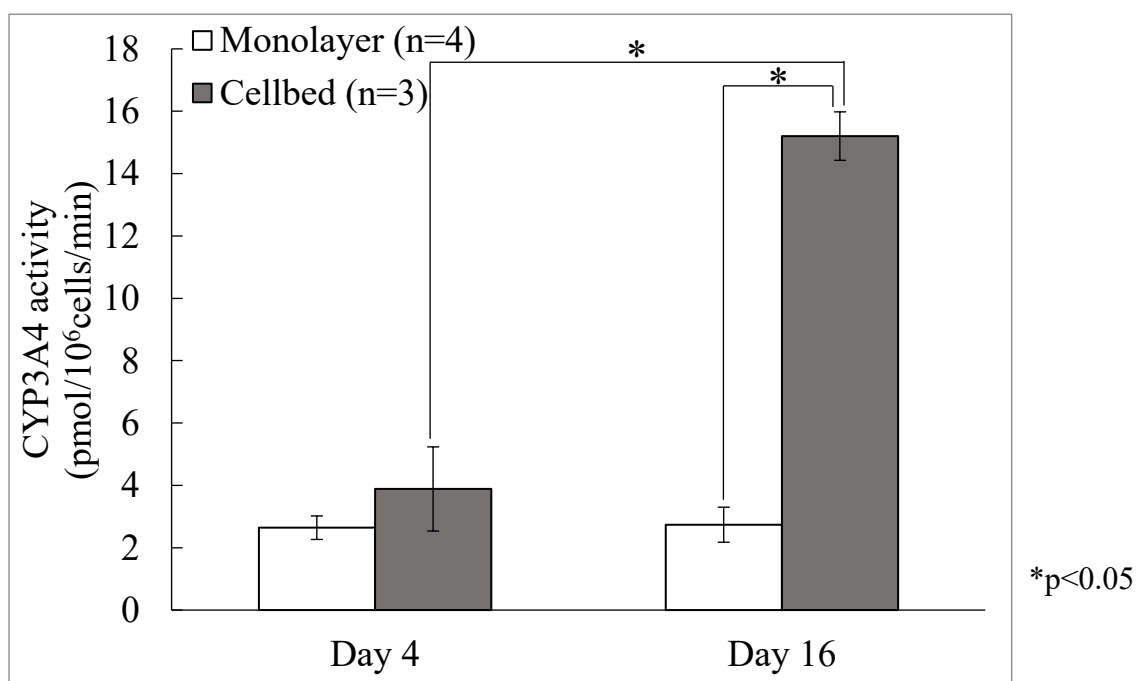


Fig. 2-4 各培養条件での CYP3A4 活性値⁹⁰⁾

早期の創薬プロセスにおいて新規の候補化合物の効果、安全性を評価することは、創薬の期間短縮やコストの削減のために重要であり、肝臓での毒性、代謝、動態を効率よく予測できる評価系の開発が希求されている。

遺伝子発現解析フォーカスタレイである三菱レイヨン社製の **Genopal[®]** は、従来の平面基板型の形状に対し、貫通孔基板を用いている。貫通孔内の三次元空間にプローブを末端固定し、広い反応場を利用して高い感度を持ち、それらを配向して樹脂で固め、スライスして製造することによって、比較的安価なコストで DNA チップの作成が可能であるとともに、チップ間の高い再現性を可能としている⁹¹⁾。

本研究室では **Genopal[®]** に搭載する遺伝子群を検討し、肝細胞の肝臓としての機能や状態及び薬剤応答を評価するための肝細胞評価用チップとして共同開発を行っている。現在、DNA チップには肝臓の薬物代謝に関わる遺伝子群や分化に関わる遺伝子群を搭載しており、この DNA チップを肝臓細胞チップ (**Genopal[®] customized Hepatocyte chip**) として受託解析を開始している⁸³⁾。

Genopal[®] customized Hepatocyte chip の用途として、CYP 等の酵素誘導の評価や、前駆細胞などの分化誘導や形質転換の評価等が挙げられる。さらに数万の遺伝子数の網羅的解析ではなく、数百の遺伝子数に絞る精密解析により、繰返測定に向いておりチップの再現性、感度、正確性、迅速性に優れている。

本章では、肝細胞に関する 188 の遺伝子の発現量を測定する **Genopal[®] customized Hepatocyte chip** を用いて、成人肝細胞の機能の長期維持が示唆された **Cellbed[®]** 培養が与える各遺伝子への影響を評価した。

2-2 実験方法

2-2-1 使用細胞、使用試薬、器具及び機器

1)使用細胞

BIOPREDIC International 社にて調製された成人肝細胞(Human cryopreserved hepatocytes)(Lot: HEP187268-TR-05)を、ケー・エー・シー (株) より購入し、実験に用いた。

また、米国セルシステムズ社が、インフォームドコンセントに基づいて研究用に取得したヒト胎児由来正常肝細胞 (Human normal hepatocyte : Hc 細胞)を、DS ファーマバイオメディカル (株) より購入し、実験に用いた。

2)使用試薬

①PBS(-)調製用

塩化ナトリウム〈特級〉(NaCl)	ナカライテスク
塩化カリウム〈特級〉(KCl)	ナカライテスク
リン水素二ナトリウム・12水和物〈特級〉(Na ₂ HPO ₄ ・12H ₂ O)	ナカライテスク
リン酸二水素カリウム〈特級〉(KH ₂ PO ₄)	和光純薬工業

②細胞分散用

Trypsin-EDTA	GIBCO
--------------	-------

③細胞染色用

Trypan Blue	和光純薬工業
-------------	--------

④細胞凍結保存用

液体窒素	内村酸素
ジメチルスルホキシド〈特級〉((CH ₃) ₂ SO) [DMSO]	ナカライテスク

⑤器具洗浄用

次亜塩素酸ナトリウム (アンチホルミン) (NaClO)	ナカライテスク
洗浄液 (Fine Clean CL)	東京硝子機器

⑥消毒用

エチルアルコール〈一級〉(CH ₃ CH ₂ OH)	ナカライテスク
--	---------

⑥成人肝細胞用培地

Additives for hepatocyte culture medium (1.6mL) ADD222	BIOPREDIC
Additives for hepatocyte seeding medium (12.7mL) ADD221	BIOPREDIC
Basal hepatic cell medium (100mL) MIL600	BIOPREDIC
Basal hepatic cell medium (500mL) MIL700	BIOPREDIC
Thawing medium without additives for hepatocytes (100mL) MIL261	BIOPREDIC
Long term culture medium for human hepatocytes,10X (55mL)	BIOPREDIC

⑦Hc 細胞用培地

D-MEM/F12	GIBCO
HEPES	DOJINDO
炭酸水素ナトリウム(NaHCO ₃)	ナカライテスク
Penicillin(ペニシリン G カリウム)	明治製菓ファルマ
Streptomycin(硫酸ストレプトマイシン)	明治製菓ファルマ

⑧ウシ胎児血清(Fetal Bovine Serum : FBS)

ウシ胎児血清(FBS)	GIBCO
Human-acidic FGF	PEPROTECH

3)使用機器及び器具

位相差型倒立顕微鏡(ECLIPSE-TE300)	Nikon
細胞計数用顕微鏡(OLYMPUS BH-2)	OLYMPUS
バイオハザード対策用クラスIIキャビネット	DALTON
CO ₂ インキュベーター(MCO-175)	SANYO
遠心分離機(Table-top 遠心機 510)	久保田製作所
電子天秤(AD135-S/FACT)	METTLER TOLEDO
pH メーター(MP220)	METTLER TOLEDO
純水装置(RFP343RB)	ADVANTEC
超純水装置(RFO585DA)	ADVANTEC
高温蒸気滅菌器(HV-110)	HIRAYAMA
恒温器ソフトインキュベーター(SLI-170D)	EYELA
ナチュラルオープン(NDO-600ND)	EYELA
チューブポンプ(RP-2000)	EYELA
培養ピペット(1,2,5,10,20mL)	岩城硝子
パスツールピペット	岩城硝子
蓋付き培地ビン	岩城硝子
蓋付き遠心管	岩城硝子
スクリーバイアル瓶	岩城硝子
0.22μm 濾過滅菌フィルター(sterivex-SVGP01050)	MILLIPORE
0.45μm 濾過滅菌フィルター(DISMIC-13CP Cellulose Acetate)	ADVANTEC
Magnetic stirrer(SR550)	ADVANTEC
SLGC 血球計算盤(Burker-Turk)	クライミング
セラムチューブ(1.2mL 用)	住友ベークライト
動物細胞凍結処理容器(BICELL)	日本フリーザー
マイクロピペット(50,100,200,1000μL)	Thermo
Collagen I 24 well plate	CORNING
Cellbed [®] 24 well plate	日本バイリーン
細胞培養ディッシュ(φ35 mm)	FALCON
細胞培養用マルチプレート 24 well	住友ベークライト

2-2-2 試薬の調製法

1)使用培地の組成

成人肝細胞用培地の組成を Table2-1 ~ 4 に示した。

Table 2-1 成人肝細胞融解用培地(Thawing medium)

Reagents	Concentration
Leibovitz 15 medium with Glutamax	-

Table 2-2 成人肝細胞播種用培地(Seeding medium)

Williams E medium with Glutamax	Concentration
Penicillin	100 IU/mL
Streptomycin	100 µg/mL
Bovine insulin	4 µg/mL
Fetal calf serum	10 % v/v

Table 2-3 成人肝細胞培養用培地(Incubation medium)

Williams E medium with Glutamax	Concentration
Penicillin	100 IU/mL
Streptomycin	100 µg/mL
Bovine insulin	4 µg/mL
Hydrocortisone hemisuccinate	50 µM

Table 2-4 成人肝細胞維持用培地(Long-Term culture medium)

Williams E medium with Glutamax	Concentration
HEPES:2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid	10 mM
Gentamicin	50 µg/mL
Epidermal growth factor	100 ng/mL
Insulin	10 µg/mL
Glucagon	4 µg/mL
Bovine serum albumin	0.5 mg/mL
Linoleic acid	5 µg/mL
Hydrocortisone	10 µM
Selenium	100 nM
Cholera toxin	2 ng/mL
Liver growth factor	20 ng/mL
Transferrin	5 µg/mL
Ethanolamine	10 µM
Prolactin	100 ng/mL
Somatotropin	1 µg/mL
Thyrotropin-releasing factor	10 µM

Hc 細胞用培地の組成を Table 2-5 に示した。

Table 2-5 Hc 細胞増殖用培地(D-MEM/F12)

Reagents	Concentration
D-MEM/F12	12.0 g/L
HEPES	3.57 g/L
NaHCO ₃	1.2 g/L
Penicillin	58.8 mg/L
Streptomycin	100 mg/L
FBS(Human acidic FGF 含有)	100 mL/L

2)調製法

①成人肝細胞播種用培地(Seeding medium)の調製法

Basal hepatic cell medium (100mL) MIL600 に Additives for hepatocyte seeding medium (12.7mL)ADD221 を添加した。

②成人肝細胞維持用培地の調製法

維持用培地は、Basal hepatic cell medium に付属している Long term culture medium for human hepatocytes,10X(55mL)を、Basal hepatic cell medium (500mL) MIL700 に全量溶解させた。

③D-MEM/F12 の調製法

D-MEM/F12 は超純水 850mL に 1 袋(12g)加え、Penicillin 58.8mg、Streptomycin 100mg、HEPES 3.57g、NaHCO₃ 1.2g をそれぞれ加え 3 時間攪拌した。攪拌終了後、pH7.2 に調整し、メスアップを行い全量 900mL に調製した。その後、さらに 1 時間攪拌し、孔径 0.22 μ m の滅菌フィルターで濾過滅菌した後、培地瓶に分注した。調製後は 4°C で保存した。

④Human-acidic-FGF 含有 (0.1 μ g/mL) FBS の調製法

50 μ g の Human-acidic-FGF を冷却遠心(5000rpm 1min 4°C)し、粉を試薬瓶底に落としてから滅菌済み超純水 1mL を加えた。ボルテックスを用い、完全に溶解してから再度冷却遠心(5000rpm 1min 4°C)した。その後、FBS 500mL に全量添加して混合した。調製後は 4°C で保存した。

⑤Hc 細胞増殖用培地の調製法

Hc 細胞増殖用培地は、使用直前に D-MEM/F12 90% + Human acidic FGF 含有 FBS 10%の割合になるように調製し用いた。

⑥Ca・Mg free Phosphate buffer saline:PBS(-)調製法

塩化カリウム(KCl)を 0.02g、塩化ナトリウム(NaCl)を 8.00g、リン酸水素二ナトリウム・12 水和物(Na₂HPO₄・12H₂O)を 2.88g、リン酸二水素カリウム(KH₂PO₄)を 0.20g 精秤し、1L の超純水に溶かして約 3 時間攪拌した。溶解後、0.22 μ m フィルターにより濾過滅菌を行った。滅菌後、-20°C で冷凍保存し、使用直前に解凍して使用した。解凍後は 4°C で保存した。

⑦Trypsin-EDTA 溶液の調製法

GIBCO の Trypsin(0.5%)-EDTA(5.3mM)溶液 100mL に、PBS(-)を 900mL 加え、約 1 時間静かに攪拌した(最終 Trypsin 濃度 0.05%)。攪拌後、0.22 μ m フィルターにより濾過滅菌を行った。滅菌後、 -20°C で冷凍保存し、使用直前に解凍して使用した。解凍後は 4°C で保存した。

⑧Trypan Blue 溶液の調製法

粉末の Trypan Blue を、PBS(-)を用いて 0.3%(w/v)になるように溶解し、調製後、一昼夜攪拌を行い、0.45 μ m フィルターにより濾過滅菌を行った。

2-2-3 滅菌法

1)乾熱滅菌

ピペットはステンレス製の滅菌缶に収納し、電気乾熱滅菌器中で 180°C 、180 分間(昇熱時間 60 分、維持時間 120 分)滅菌した。

2)高温・高圧滅菌(オートクレーブ)

フタ付き培地瓶、フタ付き遠心管、フタ付きサンプル瓶、マイクロピペット用チップ及び、乾熱滅菌が不可能な物は滅菌テープを貼りアルミホイルで口を覆い、 120°C で 45 分間(昇熱時間 30 分、維持時間 15 分)オートクレーブ滅菌した。滅菌時には超純水を 5L 使用した。

2-2-4 細胞の計数法

1)細胞の計数法(色素排除法)

細胞懸濁液をピペットマンで 100 μ L とり、マイクロチューブに入れて、Trypan Blue 溶液を 100 μ L 添加して、よくピペッティングした。その後、血球計算盤に流し込み、顕微鏡の対物レンズ 10 倍で、1mm \times 1mm の区画内の染色されなかった細胞数(生細胞数)と染色された細胞数(死細胞数)を分けて計数を行った。

2-2-5 細胞の融解法及び凍結法

1)細胞融解法(成人肝細胞)

液体窒素中に保存してある成人肝細胞のセラムチューブを取り出し、超純水で作った 40 $^{\circ}$ Cの超純水に入れて表面のみ溶けた状態になったらすぐにセラムチューブを安全キャビネットに移し、遠心管に分注し、37 $^{\circ}$ Cの Thawing medium(30mL)に直接中身を注いだ。セラムチューブ内を Thawing medium(1mL)で洗い、残った細胞も遠心管に回収し、氷が融けるまでゆっくり手で振とうし、ホモジナイズした。その後、1000rpm で 1 分間遠心分離し、DMSO を含んだ培地を吸引除去した。その後 2mL の Seeding medium を加えピペッティングし、950 μ l のトリパンブルー溶液を入れた 1.5mL のサンプリングチューブに、細胞懸濁液を 50 μ l 入れ、ゆっくりとホモジナイズした後、血球計算盤を用いて懸濁液中の生細胞数を計数した。生細胞数が 4.0×10^5 cells/mL になるように細胞懸濁液に Seeding medium を加え、Collagen I 24 well plate 及び Cellbed[®] 24 well plate に 1well 当たり、0.5mL ずつ播種した。

2)細胞融解法(Hc 細胞)

液体窒素中に保存してある Hc 細胞のセラムチューブを取り出し、超純水で作った 37 $^{\circ}$ Cの超純水に入れて、溶け始めたらずちにセラムチューブを安全キャビネットに移し、細胞毒性のある DMSO の濃度を下げるために、約 10 倍量の培地に、溶け始めた細胞懸濁液を添加混合した。その後、800rpm で 1 分間遠心分離し、DMSO を含んだ培地を吸引除去した。その後、培地 10mL を加えてピペッティングし、その一部を無菌的に取り出し、血球計算盤を用いて、色素排除法で、懸濁液中の全細胞数を計数した。計数後、播種密度が 5×10^4 cells/mL の濃度になるように植え継ぎ用に用意した新しい培地に細胞懸濁液を分注し、細胞培養ディッシュ(ϕ 35 mm)に 2mL ずつ播種した。

3)細胞凍結法(Hc 細胞)

適当な量の培地を用意し、PBS(-)、0.05 %Trypsin-EDTA とともに 37 °Cで保温した。細胞培養ディッシュから、パスツールピペットを用いて、細胞を除去しないように培地だけを除去し、次に、培養培地と同量の PBS(-)で細胞を洗浄した後、PBS(-)のみを吸引除去した。細胞を付着面から剥離するために、Trypsin-EDTA 溶液を加え、1 分間インキュベーションした後、血清培地を加え、Trypsin の作用を止め、ディッシュ表面から細胞をピペッティングにより剥がした。その後、これを遠心管に移し、800 rpm で1 分間遠心分離し、上澄みを吸引除去した。培地を沈降細胞の入った遠心管に加えて、よくピペッティングし、その一部を無菌的に取り出して、血球計算盤を用いて、色素排除法で、懸濁液中の全細胞数(生細胞+死細胞)を計数した。計数後、生細胞数が 2.0×10^6 cells/ mL になるように細胞懸濁液を残りの培地に分注し、あらかじめ氷中に保持しておいた 20 % DMSO(DMSO は室温では細胞に毒性を示すため、温度が上がらないように注意が必要)の入った増殖用培地を、細胞懸濁液と 1:1 で混合した。細胞懸濁液をセラムチューブ(アンプル)に 1 mL ずつ入れ、液体窒素が混入しないようしっかりと栓をした。その後、4 °Cで予冷していた BICELL にセラムチューブを入れ、-80 °Cで一昼夜置き、BICELL からセラムチューブを取り出し、液体窒素(-210 °C)で保存した。

2-2-6 細胞の継代法

1)細胞増殖を目的とした継代(Hc 細胞)

Hc 細胞は増殖するため、播種後、約 4 日間で継代を行った。D-MEM/F12 培地に FBS(Human-acidic FGF 含有)を 10%添加したものを必要量用意し、PBS(-)、Trypsin-EDTA とともに 37°Cで保温した。細胞培養ディッシュ(φ35 mm)からパスツールピペットを用いて、細胞を除去しないように培地だけを除去し、培養培地と同量の PBS(-)で細胞を洗浄した後、PBS(-)のみを吸引除去した。細胞を付着面から剥離するため Trypsin-EDTA を 1mL 加えて 1 分間インキュベーションした後、位相差型顕微鏡で細胞を観察し、細胞の形が変わり始めたら、血清入り培地を 1mL 加えて Trypsin の作用を止め、ディッシュ表面から培地ごと細胞を剥がした。これを遠心管に移し、800rpm で 1 分間遠心分離し、遠心後、上澄みを除去した。沈降細胞の入った遠心管に血清培地 2mL を加えて、よくピペッティングし、その一部を無菌的に取り出し、血球計算盤を用いて Trypan Blue 溶液による色素排除法で懸濁液中の全細胞数を計数した。計数後、生細胞数が 5×10^4 cells/mL になるように、別途加温していた新鮮培地に分注し、よくピペッティングした細胞懸濁液を細胞培養ディッシュ(φ35 mm) 1 枚当たり、2mL ずつ播種した。培養ディッシュは、37°C、CO₂ 濃度 5.0%、水蒸気飽和に保たれたインキュベーターに入れて、細胞を培養した。

2) 細胞培養用マルチプレート 24 well への継代(Hc 細胞)

2-2-6 の 1)の計数後、生細胞数が 5.0×10^4 cells/mL になるように植え継ぎ用に用意した培地に細胞懸濁液を分注し、よくピペッティングした。この細胞懸濁液を細胞培養用マルチプレート 24 well に 1well 当たり、0.5mL ずつ播種した。細胞培養用マルチプレート 24 well は、37°C、CO₂ 濃度 5.0%、水蒸気飽和に保たれたインキュベーターに入れて、細胞を培養した。

2-2-7 Cellbed[®]の作製方法および特徴

1)作製方法、材質

Cellbed[®]は、エレクトロスピンニング法により作製された高純度シリカファイバーからなる三次元培養担体である。

2)Cellbed[®]の特徴

Cellbed[®]は直径約1 μm の生体適合性の高いシリカファイバーから成る不織布である。その重量は単位面積当たり8g/m²で、繊維径が7~8 μm で95%以上という高い空隙率を保っており、広い表面積を持つことからより多くの細胞を保持するのに適している。また、化学的に安定性の高いシリカ100%で構成されているため、培養担体の取り扱いが非常に容易で、なお且つ細胞の培養に悪影響を与えないという特徴を持つ⁸²⁾。

2-2-8 Cellbed[®]の実験前処理及び成人肝細胞の培養

1) Cellbed[®]の実験前処理

クリーンベンチ内で袋からプレート、担体を取り出す。担体をピンセットで個別包装から取り出し、24 well plate の well に落とし込み使用する。培養担体の入った well に 70%エタノールを使用培地量と同量 well の壁面を伝わせながら添加した。(※このときチップの先端で担体を傷つけないよう注意する。) プレートを軽く揺すり、担体にエタノールが浸透したことを確認する。well 壁面にチップを当て、底に向かってゆっくりスライドさせながら 70%エタノールを除去した。使用培地量の 1.5 倍の PBS(-)を添加し、洗浄した。この一連の手順を 2 回行った。

2)成人肝細胞の培養

2-2-8の1)の実験前処理を行ったCellbed[®] 24 well plateを用意し、2-2-5の1)の手順で細胞を融解した。Monolayer培養、Cellbed[®]培養でそれぞれCollagen I 24 well plate及びCellbed[®] 24 well plateに細胞数 2.0×10^5 cell/wellで播種し、37°C、CO₂濃度 5.0%、水蒸気飽和に保たれたインキュベーターに入れて、細胞を培養した。その後、24hごとに2-2-2の2)の②で調製した成人肝細胞維持用培地で培地交換を行った。

2-2-9 走査型電子顕微鏡(SEM)による細胞及び Cellbed®の観察

1)使用試薬

Sodium Cacodylate (C ₂ H ₆ AsO ₂ Na)	和光純薬工業
Glutal aldehyde Solution (OHC(CH ₂) ₃ CHO)	和光純薬工業
t-Butyl Alcohol ((CH ₃) ₃ COH)	和光純薬工業
エチルアルコール〈一級〉(C ₂ H ₅ OH)	ナカライテスク

2)使用機器及び器具

BenchTop K	VirTis
オスミウムプラズマコーター OPC60A	Filgen
Miniscope TM3030	日本ハイテクノロジー

3)試薬の調製法

①0.2M カコジル酸緩衝液

カコジル酸ナトリウム 1.60g を Milli-Q 水 25mL に溶解させ、1N の HCl で pH7.4 に調製した後、Milli-Q 水 25mL を加えて攪拌する。

②17.5 %グルタールアルデヒド水溶液

70%グルタールアルデヒド 2mL に Milli-Q 水 6mL を加え、17.5 %グルタールアルデヒド水溶液 8mL を調製した。

③前固定液 (0.1M カコジル酸緩衝 1%グルタールアルデヒド溶液 (pH7.4))

25%グルタールアルデヒド水溶液 400μL、Milli-Q 水 4.6mL、カコジル酸緩衝液 5.0mL を混合し、前固定液とした。

④本固定液 (0.1M カコジル酸緩衝 2%グルタールアルデヒド溶液 (pH7.4))

17.5 %グルタールアルデヒド水溶液 800μL、Milli-Q 水 4.2mL、カコジル酸緩衝液 5.0mL を混合し、本固定液とした。

⑤試料脱水用エタノール

99.5%エタノールを Milli-Q 水と混合し、70、80、90、95%各濃度のエタノール溶液を調製した。

4)走査型電子顕微鏡(SEM)の原理⁹²⁾

光学顕微鏡（光顕）では、凸レンズで光を一点に収束するが、電子顕微鏡(電顕)では電子レンズを使い、電子ビームを一点に収束する。この電子ビームの収束した点（スポットビーム）が、光顕よりはるかに小さいため、電顕では光顕よりも微細な構造を観察することができる。

SEMではこのスポットビームをプローブ(探針)として、試料に照射しながら走査し、試料から得られる信号を使って像を形成する顕微鏡である。

SEMの動作原理を、Fig.2-5に示した。SEMでは電子源から放出された電子(一次電子)ビームを、陽極で加速した後、電子レンズで試料上へ微小径に収束させる。これをプローブとして二次元走査し、試料から放出される二次電子、反射電子(後方散乱された一次電子)などの信号量の違いを基に像を得ることができる。

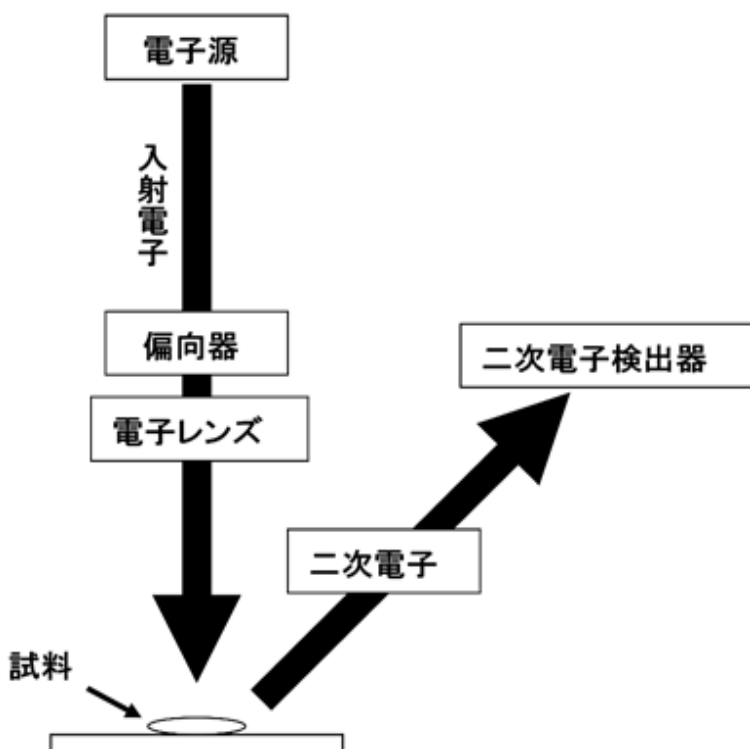


Fig.2-5 走査型電子顕微鏡の原理

5)SEM 試料作製プロトコル

①前固定

培養後の Cellbed[®]の入った well に前固定液を 500 μ l 添加し、室温で 2 時間静置した。

②本固定

前固定液をすべて除去し、Cellbed[®]の入った well に本固定液を 500 μ l 添加し、室温で 2 時間静置した。この後、PBS(-)に置換したサンプルは日本バイリーン社(株)へ送り、サンプル処理、および撮影は日本バイリーン社(株)で行った。

以下、日本バイリーン社(株)のプロトコル

サンプル処理

①脱水処理 (10,50,60,70,80,90,100%エタノール,各 20 分)

②t-ブタノール置換 (エタノール:t-ブタノール=1:1,100%t-ブタノール各 20 分)

③真空乾燥 BenchTop K(VirTis)にて真空凍結乾燥(-40°C,100mTeorr,8 時間)

④Cellbed[®]をカミソリにより圧断

⑤Cellbed[®]表面及び破断面がそれぞれ観察できるようにカーボンテープで SEM 台に固定

⑥オスミウムプラズマコーター OPC60A(Filgen)にて蒸着(膜厚 3nm)

⑦Miniscope TM3030(日立ハイテクノロジーズ)にて SEM 観察

2-2-10 細胞の RNA 精製

1)使用試薬

RNeasy Mini Kit

QIAGEN

2)使用機器及び器具

2-2-1 参照

3)細胞培養

成人肝細胞の monolayer 培養では Collagen I 24 well plate に細胞数 2.0×10^5 cell/well で播種し、Cellbed®培養では Cellbed® 24 well plate に細胞数 2.0×10^5 cell/well で播種を行った。その後 CO₂ インキュベーターで 96h 培養した。

Hc 細胞の monolayer 培養では細胞培養用マルチプレート 24 well に細胞数 2.5×10^4 cell/well で播種を行った。その後 CO₂ インキュベーターで 96h 培養した。

4)RNA の精製

細胞培養液を取り除き、PBS(-)で2回洗浄する。RNeasy Mini Kit のプロトコル通りに調整した Buffer RLT を 1well に 350μL ずつ添加し、5 分間静置し、細胞を破碎する。エッペンにサンプリングし、同量の 70%エタノールを添加し、よくピペッティングする。サンプルを 2mL コレクションチューブ中にセットした RNeasy スピнкаラムにアプライし、13000rpm で 1 分間遠心操作し、ろ液を捨てる。700μL の Buffer RW1 を添加し、13000rpm で 1 分間遠心操作し、ろ液を捨てる。500μL の Buffer RPE を添加し、13000rpm で 1 分間遠心操作し、ろ液を捨てる。500μL の Buffer RPE を添加し、13000rpm で 2 分間遠心操作し、ろ液を捨てる。スピнкаラムを新しい 2mL コレクションチューブに移し、13000rpm で 5 分間遠心操作する。スピнкаラムを 1.5mL コレクションチューブにセットし、30μL の RNase free water を添加し、13000rpm で 1 分間遠心操作し、RNA を溶出する。

2-2-11 Genopal[®] customized Hepatocyte chip の作製方法及び特徴

1) 作製方法

Genopal[®]は、樹脂で固定された中空繊維配列体をスライスすることで製造される遺伝子発現解析用フォーカストアレイであり、中空繊維中に遺伝子を検出するプローブ DNA を搭載している⁹³⁾。

2) Genopal[®]の特徴

貫通孔を利用した三次元空間にプローブをゲルを介して固定し、大容量のプローブを搭載することによって高い感度を持つ。さらに、上記の製造法によって、品質の安定したDNAチップを製造することができ、再現性の高いデータを得ることができる。

2-2-12 Genopal® customized Hepatocyte chip を用いた遺伝子解析

1) 遺伝子解析プロトコル

2-2-9 で精製した RNA サンプルは三菱レイヨン(株)へ送り、サンプル処理、および解析は三菱レイヨン(株)に委託した。

以下、三菱レイヨン(株)のプロトコル

- ① MessageAmp™ II-Biotin Enhanced を用いて cDNA を合成した。
- ② MinElute PCR Purification Kit を用いて cDNA を精製した。
- ③ MessageAmp™ II-Biotin Enhanced を用いて aRNA を合成した。
- ④ RNeasy® MinElute™ Cleanup Kit を用いて aRNA を精製した。
- ⑤ MessageAmp™ II-Biotin Enhanced を用いて aRNA を適切な鎖長に断片化した。
- ⑥ ハイブリダイゼーションに用いる溶液組成に調製した。
- ⑦ 装置の準備、ハイブリダイゼーション、洗浄、染色、安定化処理を自動ハイブリダイゼーション装置のプロトコルに従って行った。
- ⑧ Genopal® 専用検出装置を使用して検出を行った。

2-3 結果と考察

2-3-1 Genopal[®] customized Hepatocyte chip 搭載遺伝子内訳

三菱レイヨン(株)及び国立医薬品食品衛生研究所と共同開発した Genopal[®] customized Hepatocyte chip に搭載した遺伝子を Table2-6 に示した。

Table 2-6 搭載遺伝子

遺伝子分類	*Symbol	搭載遺伝子数
cytochrome P450 family	<i>CYP3A4</i> <i>CYP3A7</i>	11
carboxylesterase	<i>CES1</i> <i>CES2</i>	4
sulfotransferase family	<i>SULT1A1</i> <i>SULT1B1</i>	14
glutathione S-transferase	<i>GSTA1</i> <i>GSTP1</i>	4
UDP glucuronosyltransferase family	<i>UGT1A1</i> <i>UGT2B10</i>	4
solute carrier family	<i>SLC10A2</i> <i>SLC22A1</i>	4
solute carrier organic anion transporter family	<i>SLCO1A2</i> <i>SLCO1B1</i>	3
ATP binding cassette subfamily	<i>ABCB1</i> <i>ABCC2</i>	5
fibroblast growth factor	<i>FGF3</i> <i>FGFR2</i>	31
keratin	<i>KRT14</i> <i>KRT18</i>	6
v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene	<i>MYC</i> <i>MYCN</i>	6
nuclear receptor subfamily	<i>NR0B2</i> <i>NR1H4</i>	4
other	<i>MET</i> <i>VIM</i>	87
control	<i>ACTB</i> <i>GAPDH</i>	5

* Symbol では搭載遺伝子中から 2 例を挙げた。

遺伝子の内訳として、薬物代謝の第 I 相反応に関わる *CYP3A4* や *CYP2C9* などの cytochrome P450 family (*CYP* 群)を 14 種、エステル結合や、アミド結合によって分子修飾された薬物の代謝における代表的な酵素である carboxylesterase を 4 種搭載し、薬物代謝の第 II 相反応に関わる遺伝子として硫酸転移酵素である *SULT1A1* などの sulfotransferase family(*SULT* 群)を 6 種、グルタチオン S-転移酵素である *GSTA1* などの glutathione S-transferase を 4 種、UDP-グルクロン酸転移酵素である *UGT1A1* などの UDP glucuronosyltransferase family を 4 種搭載した。また、薬物代謝の第 III 相反応に関わる遺伝子としては、*SLC22A1* や *SLCO1A2* などの solute carrier family (*SLC* 群)を合わせて 37 種、多剤トランスポーターである *ABCB1* や *ABCC2* などの ATP binding cassette subfamily(ABC トランスポーター)を 11 種搭載した。さらに線維芽細胞増殖因子である *FGF3* などの fibroblast growth factor を 4 種、細胞骨格を構成するタンパク質である *KRT14* などの keratin を 4 種、がんに関連する *MYC* などの v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene を 3 種、核内受容体である *NROB2* などの nuclear receptor subfamily を 5 種、その他の遺伝子 87 種とコントロール遺伝子 5 種を合わせて計 188 の遺伝子を搭載した。

また、解析で得られたデータを 5 種のコントロール遺伝子(*ACTB*、*GAPDH*、*RPLP0*、*RPS5*、*RPS18*)の中央値からコントロール補正值を取り、チップ間補正後のシグナル強度を算出した。

2-3-2 同条件での各細胞の scatter plot

monolayer 培養で 96 時間培養した条件の成人肝細胞から得られた Genopal[®] customized Hepatocyte chip の結果より scatter plot を作成し、Fig. 2-6 に示した。

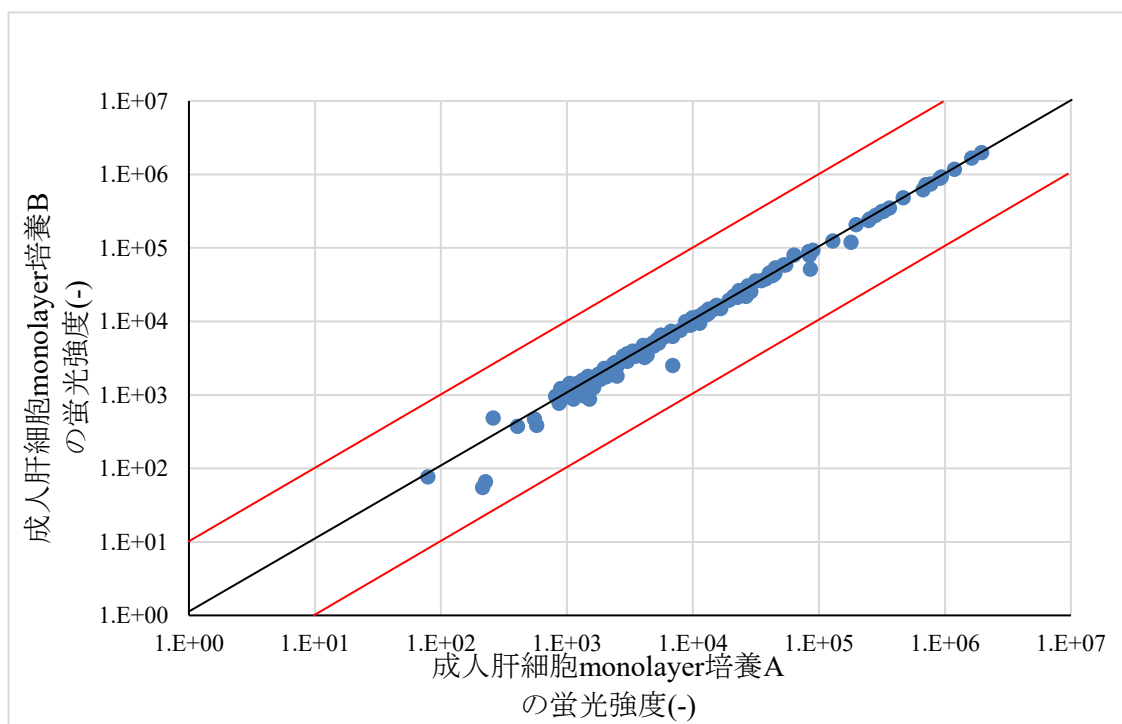


Fig. 2-6 同条件での成人肝細胞 monolayer 培養での発現遺伝子の scatter plot

同条件の成人肝細胞の測定結果より作成された scatter plot から正の相関関係が得られ、Genopal[®] customized Hepatocyte chip の再現性が示唆された。

monolayer 培養で 96 時間培養した条件の胎児肝細胞から得られた Genopal[®] customized Hepatocyte chip の結果より scatter plot を作成し、Fig. 2-7 に示した。

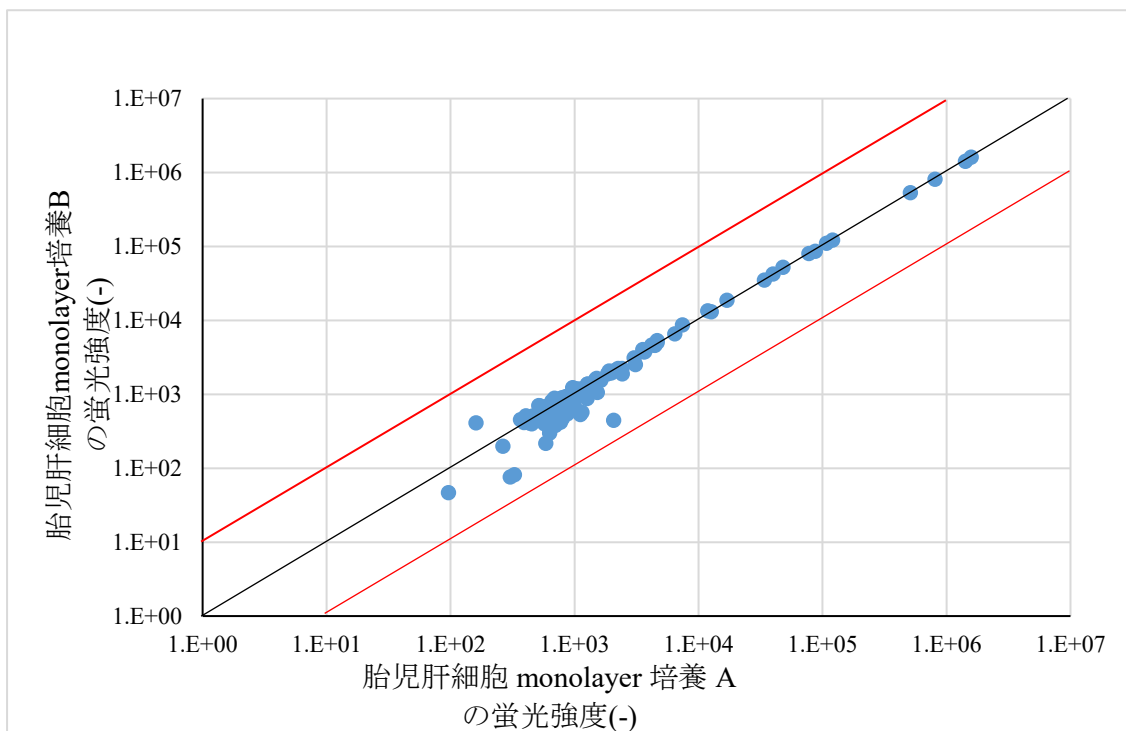


Fig. 2-7 同条件での胎児肝細胞 monolayer 培養での発現遺伝子の scatter plot

同条件の胎児肝細胞の測定結果より作成された scatter plot においても正の相関関係が得られ、Genopal[®] customized Hepatocyte chip の再現性が示唆された。

成人肝細胞と胎児肝細胞から得られた Genopal[®] customized Hepatocyte chip の結果より scatter plot を作成し、Fig. 2-8 に示した。

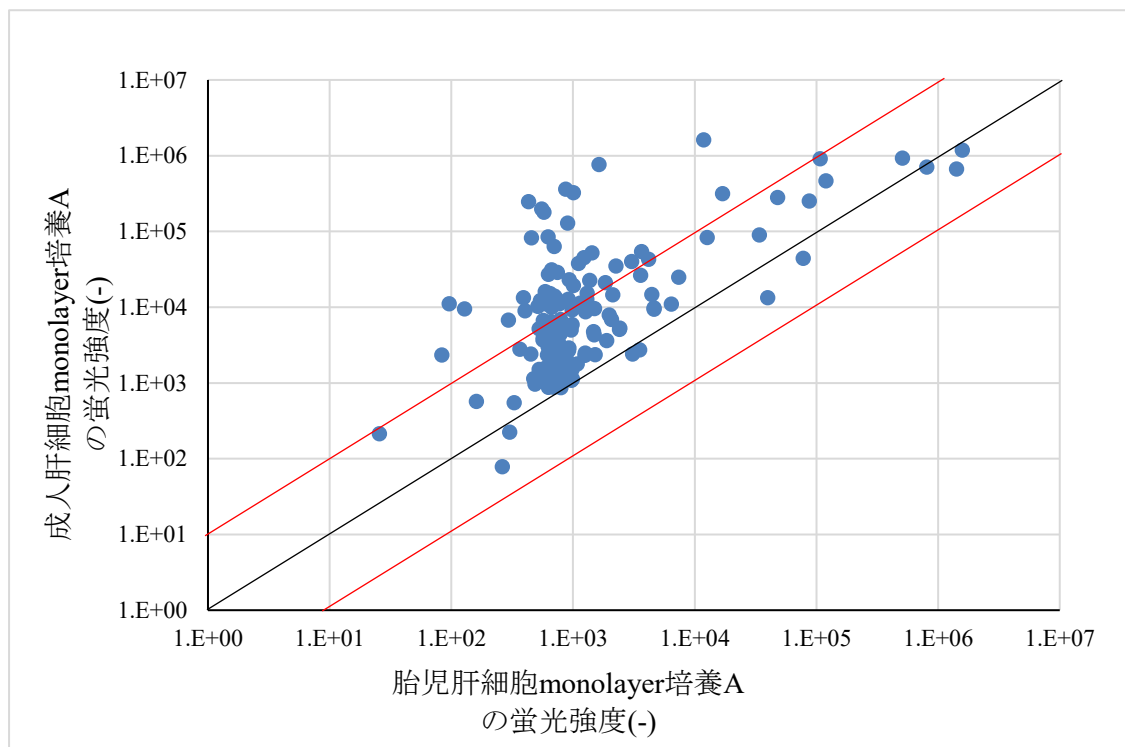


Fig. 2-8 成人肝細胞と胎児肝細胞の各 monolayer 培養での発現遺伝子の scatter plot

成人肝細胞と胎児肝細胞の測定結果より作成された scatter plot からは正の相関関係は確認されなかった。

これらの結果より、この Genopal[®] customized Hepatocyte chip はサンプル間の違いを評価できるものであると同時に、同条件のサンプルにおいては高い再現性を持つことが示唆された。

2-3-3 培養終了後の SEM による成人肝細胞の形態観察

Fig. 2-9 に、成人肝細胞培養終了後の Cellbed[®]の SEM 写真を示した。

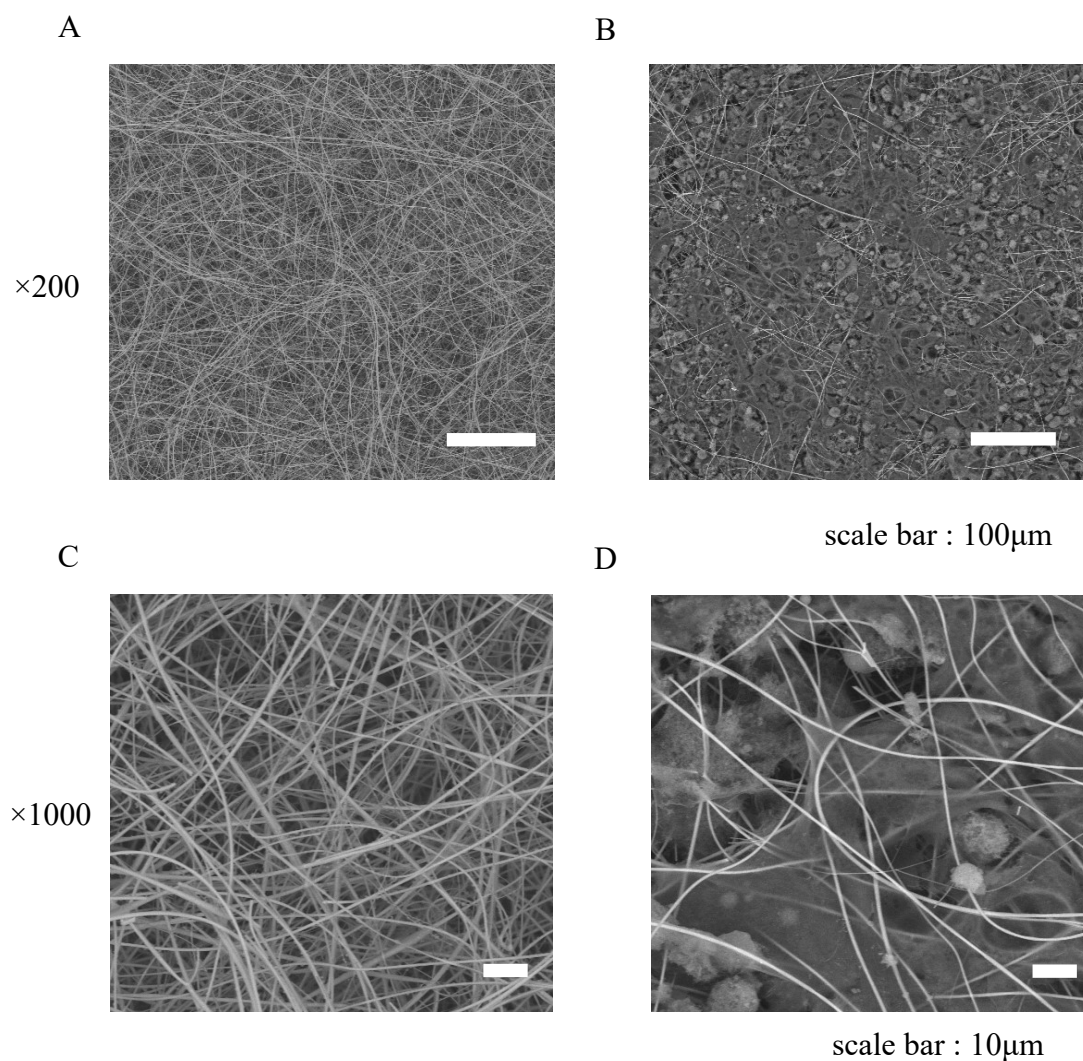


Fig. 2-9 成人肝細胞培養終了後の各 Cellbed[®]の SEM 観察画像
(A,C:細胞なし B,D:培養 16 日目)

Cellbed[®]培養 16 日間で細胞がシリカファイバー内部に接着し、細胞層を形成している様子が観察された。また、細胞の形態は、一般に肝機能発現に有利であるとされる球状⁷³⁾の状態であることが示された。

2-3-4 各培養条件での成人肝細胞の遺伝子解析

96 時間培養後の成人肝細胞の monolayer 培養と Cellbed®培養での肝機能に関連する遺伝子解析の結果を、monolayer 培養を基準にして、その発現比を Fig. 2-10 に示した。また、両培養系でのがん化に関連する遺伝子の発現比を Fig. 2-11 に示した。

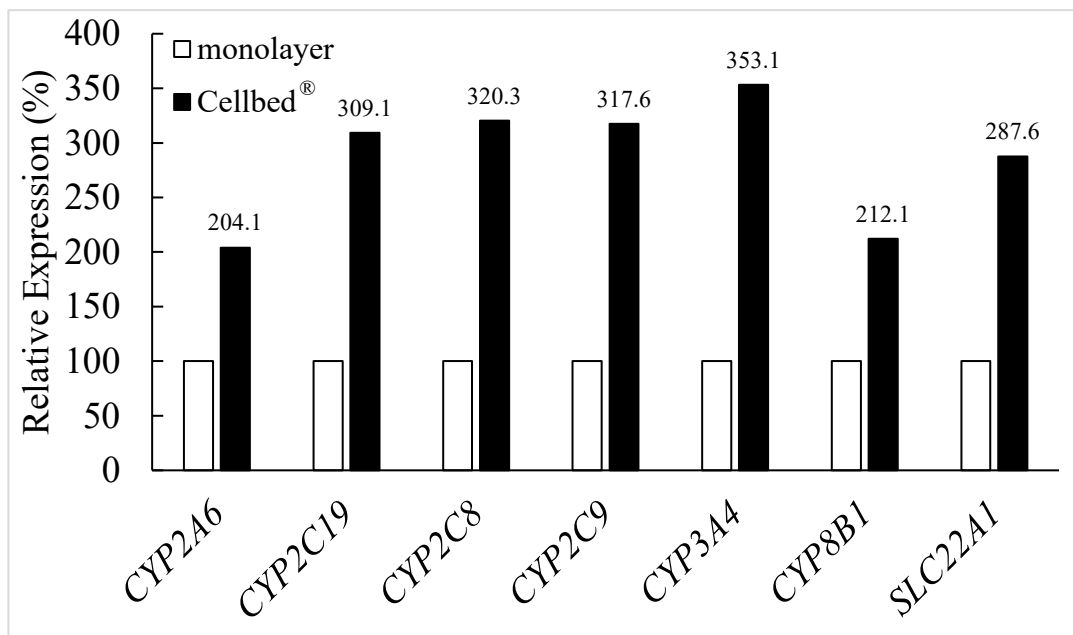


Fig. 2-10 成人肝細胞に関する遺伝子の発現比

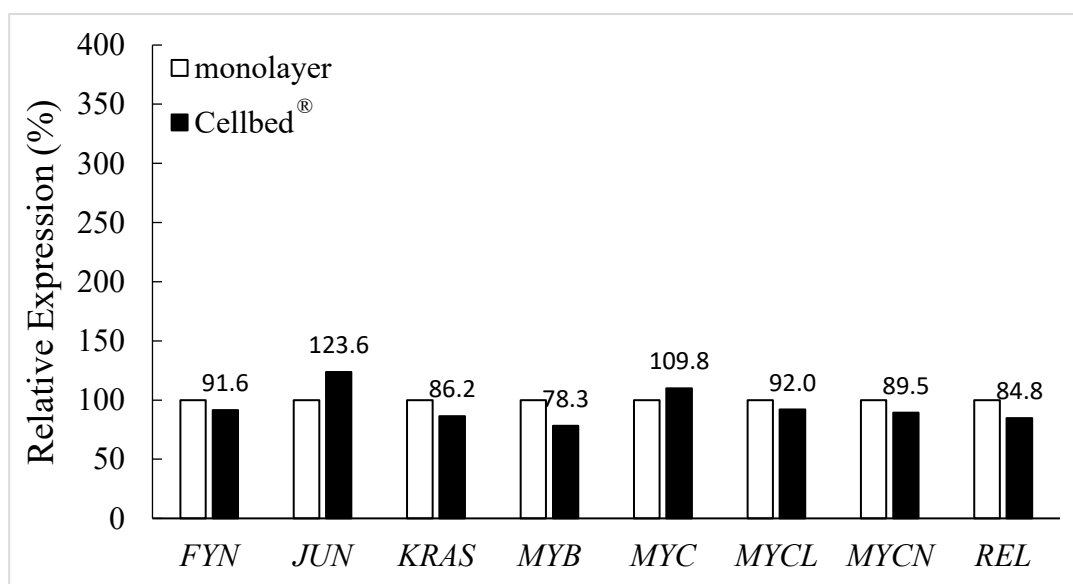


Fig. 2-11 がんに関連する遺伝子の発現比

Cellbed®培養によりいくつかの遺伝子で特に高い発現上昇がみられた。特徴的傾向として薬物代謝酵素(*CYP*)の遺伝子発現上昇が確認された(Fig. 2-10)。また一方で、肝機能とは無関係であるがん化に関する遺伝子発現では、monlayer培養、Cellbed®培養ともに、顕著な差が見られなかった(Fig. 2-11)。

したがって、Cellbed®培養により培養4日目で向上した肝機能関係の遺伝子発現は、有意性のある結果であると考えられる。

2-4 総括

本章では、肝細胞に関する 188 の遺伝子の発現量を測定できる Genopal[®] customized Hepatocyte chip を用いて、成人肝細胞の機能の長期維持が示唆された Cellbed[®]培養が与える各遺伝子発現への影響を評価した。

まず初めに、今回の実験により Genopal[®] customized Hepatocyte chip の再現性の高さが二つの成人肝細胞の scatter plot から得られた正の相関関係により確認された。

培養終了後に SEM により観察を行ったところ、全ての Cellbed[®]培養で細胞がファイバーに接着し、細胞層を形成するとともに、肝機能の発現に有利とされる球状の形態⁷³⁾を有している様子が観察され、Cellbed[®]培養による成人肝細胞の長期維持が確認された。

また、Cellbed[®]培養により、monolayer 培養に比べていくつかの遺伝子で特に高い発現上昇がみられ、傾向として CYP の遺伝子発現上昇が確認された。CYP3A は医療品代謝の約 50%に関与していることから薬物代謝に最も重要であることが知られており⁹³⁾、特に CYP3A4 はヒト肝で発現する CYP の約 30%を占めている特に代表的な分子種である⁹³⁾。この CYP3A4 の発現は monolayer と比較して約 3.5 倍高い遺伝子発現が確認された。また、それぞれ約 3.1 倍、約 3.2 倍と高い発現が確認された CYP2C19 や CYP2C9 も薬物代謝の中心となる酵素である⁹⁴⁾。これらの CYP の遺伝子発現の上昇は、Cellbed[®]培養することにより生体外で生体肝臓に近い環境を再現できたことを示唆している。また、薬物トランスポーターの一種である SLC トランスポーター系⁹⁵⁾の SLC22A1 も約 2.9 倍の発現の上昇が確認された。SLC22A1 は、肝がん細胞や肝機能に障害を有すると正常細胞に比べ顕著に発現が低下することが明らかとなっている⁹⁵⁾。本実験での Cellbed[®]培養において SLC22A1 の発現の低下が確認されなかったため、細胞は生体内での正常な機能を再現できたものと考察される。

さらに、肝機能とは無関係のがんに関連する遺伝子の発現の上昇は確認されなかったため、Cellbed[®]培養による肝機能関連遺伝子の発現上昇は、有意な結果であると思われる。

これらの結果より、Genopal[®] customized Hepatocyte chip は、サンプル間の再現性が高く、ドナー由来の個人差が発生するヒト初代凍結肝細胞や、様々な培養法を用いたヒト肝細胞あるいは代替細胞の毒性、代謝、動態の評価系として有用であることが示唆された。さらに Cellbed[®]培養は、成人肝細胞の生存率、薬物代謝活性、細胞障害の観点からの長期培養だけでなく、生体内の肝臓の機能再現にも有用であることが示唆された。

第3章 spheroid 培養を用いて三次元培養させた HepG2 細胞の薬剤耐性現象の解析

3-1 序

がん治療において、抗がん剤の効果がある場合、がんは縮小し死滅していくが、それでも完治に至らず、抗がん剤が効果を発揮していても、いずれ効かなくなってしまう現象が見られる。これは薬を使用し続けている間に、がんが薬剤に対する耐性を獲得してしまったためであり、この薬剤耐性の克服はがん治療の大きな課題となっている⁹⁶⁾。そのため、薬剤耐性克服薬の開発が求められている。薬剤耐性の克服薬として、MDR1 タンパク質の排出活性阻害剤である Verapamil²¹⁾等が知られている。しかし、Verapamil は、狭心症、心筋梗塞(急性期を除く)、その他の虚血性心疾患に適応のある薬剤であり⁹⁷⁾、それ自身が薬剤であるため、副作用を引き起こす可能性が考えられる。そのため、副作用は示さず、MDR1 タンパク質による薬物排出活性を抑制し、薬剤耐性を克服する阻害剤が望まれている。

これまでの制がん剤のスクリーニングは、主に二次元培養で行われてきたが、生体内の肝がん細胞の薬剤耐性現象を生体外での二次元培養のみで完全に再現することは難しいと考えられおり、がん細胞の薬剤耐性を克服するためには、*in vivo*におけるがん細胞の薬剤耐性現象を反映した *in vitro* での実験系が求められている。

第1章で述べたように、近年では、がんの薬剤耐性にごん細胞の三次元組織形成が関与していることが指摘されており²⁸⁾、細胞の三次元化と薬剤耐性の関連については、薬剤排出活性タンパク質である MDR1 が HIF-1 の転写活性により発現が亢進することが報告されている²⁹⁻³³⁾。

これまで本研究室では、肝がん細胞(HepG2 細胞)の三次元(spheroid)培養法を確立するとともに、モデル薬物として肝がん細胞が有する薬剤排出活性タンパク質 MDR1 によって排出することが知られ、制がん剤として利用されているドキソルビシン(DOX)を用いた排出活性測定実験を行ってきた。その結果、monolayer 培養に比べ、spheroid 培養では、MDR1 タンパク質の発現が亢進し、DOX に対する高い薬剤排出活性が示された(Fig. 3-1)。さらに、この spheroid 培養の MDR1 タンパク質の発現量は、実際の肝がん組織の発現量と同等であることが、ウエスタンブロッティングによる解析で示された(Fig. 3-2)。以上のことから、がん細胞の spheroid 培養は生体内のがん細胞の高い薬剤排出活性を、生体外で発現できる可能性が示されている⁸⁰⁾。

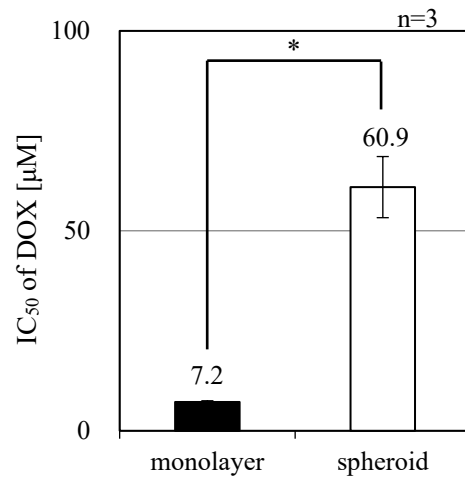


Fig.3-1 HepG2 細胞の monolayer 培養、spheroid 培養における DOX の 50%増殖抑制濃度(IC₅₀)⁸⁰⁾ **p*<0.01

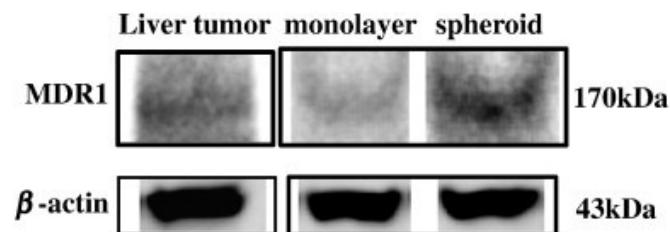


Fig. 3-2 ウェスタンブロッティング法による、生体肝がん細胞と HepG2 細胞の monolayer、spheroid 培養における MDR1 タンパク質の発現量の比較⁸⁰⁾

本章では、MDR1 の転写因子として知られている HIF-1 α の関与について、免疫染色による共焦点レーザー顕微鏡観察やウエスタンブロット解析により検討を行った。また、今回ポジティブコントロールとして塩化コバルト(CoCl_2)を使用した。塩化コバルトなどの化学的阻害剤は、通常酸素条件下で PHD の活性を抑制することができるため、PHD による水酸化修飾を受けずに疑似的な HIF-1 α の安定化に用いることができる^{49,50}。また、ウエスタンブロットで得られた結果は画像解析ソフトである ImageJ により発現量の半定量化を行った。さらに、肝細胞に関する遺伝子の発現量を測定する Genopal[®] customized Hepatocyte chip を用いて、spheroid 培養が肝がん細胞に与える MDR1 等の遺伝子発現への影響を評価した。

3-2 実験方法

3-2-1 使用細胞、使用試薬、器具及び機器

1)使用細胞

ヒト肝臓がん由来細胞の HepG2、理研バイオリソースセンターより購入したものを使用した。

2)使用試薬

①MEM 培地用

MEM (Minimum Essential Medium)	GIBCO
炭酸水素ナトリウム(NaHCO ₃)	ナカライテスク
ペニシリン G カリウム(Penicillin)	明治製菓ファルマ
硫酸ストレプトマイシン(Streptomycin)	明治製菓ファルマ

②NEAA(MEM Non-Essential Amino Acid Solution)

GIBCO

③スフェロイド形成用無血清培地(HDM 培地)

WE (Williams' medium E)	Sigma
Insulin	Sigma
EGF (Epidermal Growth Factor)	BD Biosciences
Linoleic acid	Sigma
硫酸銅・5水和物(CuSO ₄ ・5H ₂ O)	Sigma
亜セレン酸ナトリウム(Na ₂ SeO ₃)	Sigma
硫酸亜鉛・7水和物(ZnSO ₄ ・7H ₂ O)	Sigma
ペニシリン G カリウム(Penicillin)	明治製菓ファルマ
硫酸ストレプトマイシン(Streptomycin)	明治製菓ファルマ
HEPES(C ₈ H ₁₈ N ₂ O ₄ S)	DOJINDO

その他 2-2-1 の 2)参照

3)使用機器及び器具

細胞培養ディッシュ(φ100 mm)	FALCON
無処理ディッシュ(φ35 mm)	IWAKI
その他 2-2-1 の 3)参照	

3-2-2 試薬の調製法

1) 培地の種類

ヒト肝臓がん由来細胞(HepG2)を増殖させるには、増殖用培地 MEM(Minimum Essential Medium)を用い、また組織形成には、spheroid 形成用培地 HDM(Hormone Defined Medium)を用いた。

2) 使用培地の組成

培地の組成を Table3-1~2 に示した。

Table 3-1 増殖用培地(Minimum Essential Medium)

Reagent	Concentration
Minimum Essential Medium (MEM)	9.5 g (1 pack)/ L
NaHCO ₃	2.2 g/ L
Penicillin	63 mg/ L
Streptomycin	100 mg/ L

Table 3-2 spheroid 形成用無血清培地(Hormone Defined Medium)

Reagent	Concentration
WE(Williams' medium E)	10.8 g/ L
Insulin	10 mg/ L
EGF(Epidermal Growth Factor)	50 µg/ L
Linoleic acid	50 mg/ L
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.1 µM
Na ₂ SeO ₃	3 nM
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	50 pM
Penicillin	63 mg/ L
Streptomycin	100 mg/ L
NaHCO ₃	1.05 g/ L
HEPES	1.19 g/ L

3)調製法

①増殖用培地(Minimum Essential Medium)の調製法

HepG2用の増殖用培地はMEM(Minimum Essential Medium)をTable 3-1の組成になるように調製した。その後、孔径0.22 μ mの滅菌フィルターで濾過滅菌し、培地瓶に分注した。調製後は4°Cで保存し、使用直前にMEM 90% + FBS 10% + NEAA 1%の割合になるよう混合した。

②spheroid 形成用無血清培地(Hormone Defined Medium)の調製法

spheroid 形成用培地については、ラット初代肝細胞の増殖を止め、spheroid 形成を促進する無血清培地HDM(Hormone Defined Medium)をTable 3-2の組成になるように調製した。その後、孔径0.22 μ mの滅菌フィルターで濾過滅菌し、培地瓶に分注した。調製後は4°Cで保存した。

3-2-3 滅菌法

2-2-3 参照

3-2-4 細胞の計数法

2-2-4 参照

3-2-5 細胞の融解法及び凍結法

1)細胞融解法(HepG2 細胞)

液体窒素中に保存してある HepG2 細胞のセラムチューブを取り出し、37 °C の超純水に入れた。溶け始めたらすぐにセラムチューブを安全キャビネットに移し、細胞毒性のある DMSO の濃度を下げるために、約 10 倍量の培地に、溶け始めた細胞懸濁液を添加混合した。その後、1000 rpm で3分間遠心分離し、DMSO を含んだ培地を吸引除去した。その後、血清培地 10mL を加えてピペティングし、その一部を無菌的に取り出し、血球計算盤を用いて、色素排除法で、懸濁液中の全細胞数を計数した。計数後、生細胞数が 1.0×10^5 cells/mL になるように細胞懸濁液を残りの培地に分注し、細胞培養ディッシュ(φ35 mm)にディッシュ 1 枚当たり、2 mL ずつ播種した。

2)細胞凍結法(HepG2 細胞)

適当な量の培地を用意し、PBS(-)、0.05 %Trypsin-EDTA とともに 37 °C で保温した。細胞培養ディッシュから、パスツールピペットを用いて、細胞を除去しないように培地だけを除去し、次に、培養培地と同量の PBS(-)で細胞を洗浄した後、PBS(-)のみを吸引除去した。細胞を付着面から剥離するために、Trypsin-EDTA 溶液を加え、2分間インキュベーションした後、血清培地を加え、Trypsin の作用を止め、ディッシュ表面から細胞をピペティングにより剥がした。その後、これを遠心管に移し、1000 rpm で3分間遠心分離し、上澄みを吸引除去した。培地を沈降細胞の入った遠心管に加えて、よくピペティングし、その一部を無菌的に取り出して、血球計算盤を用いて、色素排除法で、懸濁液中の全細胞数(生細胞+死細胞)を計数した。計数後、生細胞数が 2.0×10^6 cells/mL になるように細胞懸濁液を残りの培地に分注し、あらかじめ氷中に保持しておいた 20 % DMSO(DMSO は室温では細胞に毒性を示すため、温度が上がらないように注意が必要)の入った増殖用培地を、細胞懸濁液と 1:1 で混合した。細胞懸濁液をセラムチューブ(アンプル)に 1 mL ずつ入れ、液体窒素が混入しないようしっかりと栓をした。その後、4 °C で予冷していた BICELL にセラムチューブを入れ、-80 °C で一昼夜置き、BICELL からセラムチューブを取り出し、液体窒素(-210 °C)で保存した。

3-2-6 細胞の継代法

1)細胞増殖を目的とした継代(HepG2 細胞)

HepG2 細胞は増殖するため、播種後、約 6 日間で継代を行った。HepG2 細胞用増殖培地を必要量用意し、PBS(-)、Trypsin-EDTA とともに 37 °C で保温した。細胞培養ディッシュ(φ35 mm)からパスツールピペットを用いて、細胞を除去しないように培地だけを除去し、PBS(-)2mL で細胞を洗浄した後、PBS(-)のみを吸引除去した。細胞を付着面から剥離するため Trypsin-EDTA を 1 mL 加え、37 °C で 2 分間インキュベーションした後、血清入り培地を 1 mL 加えて Trypsin の作用を止め、ディッシュ表面から培地ごと細胞を剥がした。これを遠心管に移し、1000 rpm で 3 分間遠心分離し、遠心後、上澄みを除去した。沈降細胞の入った遠心管に血清入り培地 4 mL を加えて、よくピペッティングし、その一部を無菌的に取り出し、血球計算盤を用いて Trypan Blue 溶液による色素排除法で懸濁液中の全細胞数(生細胞数+死細胞数)を計数した。計数後、生細胞数が 5.0×10^4 cells/ mL になるように、別途加温していた新鮮培地に分注し、よくピペッティングした細胞懸濁液を細胞培養ディッシュ(φ100 mm) 1 枚当たり、10 mL ずつ播種した。培養ディッシュは、37 °C、CO₂ 濃度 5.0 %、水蒸気飽和に保たれたインキュベーターに入れて、細胞を培養した。

3-2-7 spheroid 培養法 (poly-L-glutamic acid による被覆方法)

1)使用試薬

poly-L-glutamic acid

Sigma

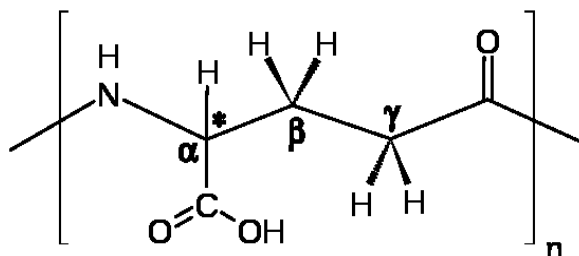


Fig. 3-3 poly-L-glutamic acid の構造式

2)使用機器及び器具

2-2-1の3)及び3-2-1の3)参照

3)poly-L-glutamic acidの被覆

poly-L-glutamic acidは親水性であるので溶媒として超純水を用い、1 mg/mLになるように調製した。調製した溶液を0.22 μ m の滅菌フィルターを用いて濾過滅菌し、これを無処理ディッシュ(ϕ 35 mm)に、ディッシュ1枚当たり2mLずつ入れ、37°Cで1時間以上インキュベートを行った。その後、溶液を除去し、spheroid形成用培地HDM培地を入れて、細胞播種直前まで培地との平衡化を行った。

4)播種方法

細胞の播種は、3-2-6の1)の細胞増殖を目的とした継代の遠心操作まで同様に行った。遠心分離後、Trypsin-EDTAを含んだ培地を除去し、spheroid形成用の培地であるHDM(Hormone defined medium)を沈降細胞の入った遠心管に加えて、よくピペッティングし、その一部を無菌的に取り出し、血球計算盤を用いてTrypan Blue溶液による色素排除法で懸濁液中の生細胞数を計数した。よくピペッティングした細胞播種用懸濁液をpoly-L-glutamic acidを被覆した無処理ディッシュ(ϕ 35 mm)に、 2.0×10^5 cells/dishの濃度で播種し、37°C、CO₂濃度5.0%、水蒸気飽和に保たれたインキュベーターに入れて、細胞を培養した。

5)培地交換

培地交換はspheroid形成用の培地であるHDM(Hormone defined medium)を用いて播種後、48時間毎に行い、96時間培養してspheroidを形成させた。

3-2-8 HIF-1 α の免疫染色法

1)使用試薬

塩化コバルト・6水和物($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	SIGMA
一次抗体：Anti-HIF-1alpha antibody(ab113642)	abcam
二次抗体：Goat Anti-Mouse IgG H&L(ab96879)	abcam
TO-PRO3	Invitrogen
10%中性緩衝ホルマリン液	和光純薬工業
Triton X-100	和光純薬工業
TWEEN20	和光純薬工業
PBS(-) 2-2-1 の 2)参照	

2)使用機器及び器具

導電パーツボックス	アズワン
共焦点レーザー顕微鏡 (TCS-SP)	Leica
glass bottom dish($\phi 35$ mm)	MatTek

3)調製法

①塩化コバルトの調製法

塩化コバルト・6水和物 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (MW : 273.93)(粉末)を超純水で 10mM になるように調製し、 -20°C で保存した。また、使用直前に最終濃度 $200\mu\text{M}$ になるように培地で調製した。

4)細胞培養

monolayer 培養では、HepG2 細胞を、glass bottom dish($\phi 35$ mm)に 2.0×10^4 cell/dish で播種し、spheroid 培養は、poly-L-glutamic acid を被覆した glass bottom dish($\phi 35$ mm)に 2.0×10^5 cells/dish で播種し、それぞれ4日間培養を行った。また、monolayer 培養では培養3日目に $200\mu\text{M}$ 塩化コバルト含有培地で培地交換を行ったものを用意し、HIF-1 α 発現細胞の positive control とした。

5)実験手順

①固定処理

細胞を PBS(-)で洗浄後、4%中性緩衝ホルマリン溶液を添加した(10 分間、室温でインキュベート)。

②膜透過処理

1%Triton X-100 含有 PBS(-)を添加した(30 分間、室温でインキュベート)。

③Blocking 処理

0.01%TWEEN 20 含有 PBS(-)で洗浄後、0.1%TWEEN 20 含有 10%ヤギ血清 PBS(-)を添加した(30 分間、室温でインキュベート)。

④一次抗体反応

0.01%TWEEN 20 含有 PBS(-) で洗浄後、一次抗体 Anti-HIF-1 α antibody(ab113642)を 0.01%TWEEN 20 含有 10%ヤギ血清 PBS(-)で 200 分の 1 希釈したものを添加した(2 時間、室温、遮光でインキュベート)。

⑤二次抗体反応

0.01%TWEEN 20 含有 PBS(-)で洗浄後、二次抗体 Goat Anti-Mouse IgG H&L(ab96879)を PBS(-)で 250 分の 1 希釈したものを添加した(1 時間、室温、遮光でインキュベート)。

⑥核染色

PBS(-)で洗浄後、1mM TO-PRO-3 を PBS(-)で 2 μ M に希釈したものを添加した(10 分間、室温、遮光でインキュベート)。

⑦観察

染色後、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察を行った(共焦点レーザー顕微鏡の波長は FITC 標識 : 500~550nm および TO-PRO-3 : 647~740nm)。

4) 共焦点レーザー顕微鏡の原理

Fig. 3-4 に示すように、光源から発射されたレーザー光は、イルミネーションピンホールを通った後、ビームスプリッターによって光が屈折し、対物レンズ (objective lens) を通して、観察試料を照射する。試料から戻ってきた光は、再び対物レンズによって集光される。ここで、共焦点が結ばれる位置にはピンホールフィルターが置かれているため、焦点面以外からの光はピンホールフィルターによって遮断される。そのため、焦点面での薄い断面の画像を得ることができる。また、光源としてレーザーを用いているため、ピンホールによって光が遮断されても十分な明るさを得ることができる。また、レーザー光は、波長がそろっているため、蛍光色素の励起に適しており、そのため共焦点レーザー顕微鏡は蛍光画像の取得に適している。

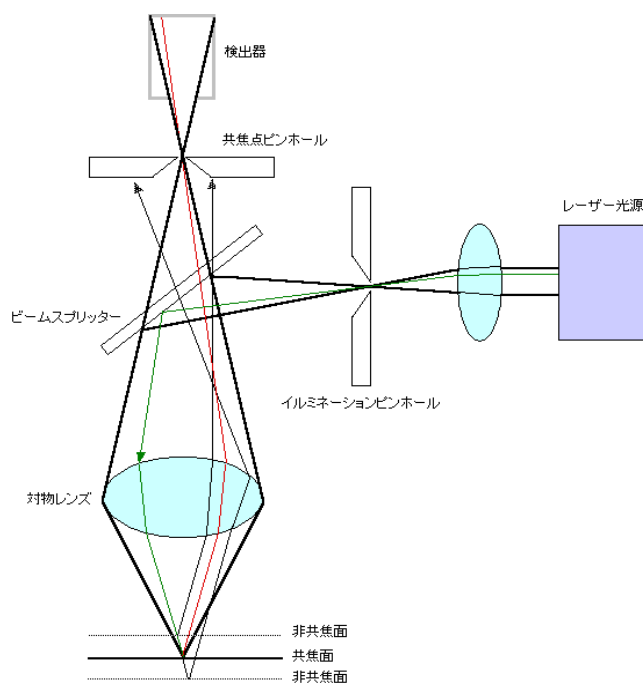


Fig. 3-4 共焦点レーザー顕微鏡の光路図

3-2-9 HIF-1 α のウエスタンブロット法

1)使用試薬

一次抗体(HIF) : Anti-HIF-1 α antibody(ab113642) abcam

一次抗体(Actin) : MONOCLONAL ANTI-BETA-ACTIN
antibody produced in mouse(SAB1305554-40TST)

SIGMA ALDRICH

二次抗体 : goat anti-mouse IgG-HRP(sc-2005)

Santa Cruz

Bradford Protein Assay Kit

タカラバイオ

BSA Standard Solution

タカラバイオ

NuPAGE[®] Novex 4-12% Bis-Tris Gel

Life Technologies

NuPAGE[®] LDS Sample Buffer

Life Technologies

NuPAGE[®] Sample Reducing Agent

Life Technologies

NuPAGE[®] Antioxidant

Life Technologies

NuPAGE[®] MOPS SDS Running Buffer

Life Technologies

MagicMark[™] XP Western Protein Standard

Life Technologies

SimplyBlue[™] SafeStain

Life Technologies

Tris Buffered Saline with Tween[®]20

タカラバイオ

RIPA Buffer

和光純薬工業

Western BLoT Quant HRP Substrate

タカラバイオ

Western BLoT Blocking Buffer

タカラバイオ

2)使用機器及び器具

サーマルサイクラー マスターサイクラーexus gradient

Eppendorf

垂直型ミニ電気泳動システム XCell SureLock Mini-Cell

Invitrogen

パワーサプライ MIDI 250 Power Supply MP-250N

Major Science

回転式振とう機

TAITEC

ゲルトランスファー装置 iBlot Dry Blotting System

Invitrogen

PVDF 膜 iBlot PVDF Transfer stacks,Mini

Invitrogen

化学発光検出装置 Lumi VisionPRO

アイシン精機

3)使用ソフトウェア

ImageJ

NIH

4)タンパク質の定量(Bradford Protein Assay)

標準プロトコル（定量範囲：25~1000 $\mu\text{g/ml}$ ）【200 μl 反応系】

①BSA 標準溶液の希釈系列を作製する(Table 3-1)。

Table 3-3 タンパク量を測定するための BSA 標準溶液の希釈系列

2mg/ml BSA Standard(μl)	希釈液(μl)	BSA の終濃度($\mu\text{g/ml}$)
50	50	1000
30	50	750
20	60	500
20	140	250
10	150	125
5	395	25
0	100	0(Blank)

②マイクロプレートの各 well に作製した BSA 標準溶液の各希釈液、サンプルをそれぞれ 4 μl 分注する。各希釈液、サンプルともに n=2 以上並行で測定する。

③200 μl の Bradford Dye Reagent を各 well に加え、よく混合する。25 $^{\circ}\text{C}$ 前後の室温において 5 分間反応させる。

④プレートリーダーを用いて、595nm の吸光度を測定する(反応後の測定は一時間以内に行う)。

⑤Blank 値を差し引いた後、n=2 以上で測定したサンプルの平均値をとる。BSA 標準液の希釈系列から作成した標準曲線を用いて、サンプルの濃度を求める。

5)細胞培養

monolayer 培養では、細胞を細胞培養ディッシュ($\phi 100\text{ mm}$)に 2.0×10^5 cell/dish で播種し、spheroid 培養は、poly-L-glutamic acid を被覆した無処理ディッシュ($\phi 35\text{ mm}$)に 2.0×10^5 cells/dish で播種し、それぞれ 4 日間培養を行った。また、monolayer 培養では培養 3 日目に 200 μM 塩化コバルト含有培地で培地交換を行ったものを用意し、HIF-1 α 発現細胞の positive control とした。

6)SDS-PAGE サンプル調製

培養した細胞をセルスクレーパーで回収し、2000rpm で1分間遠心し、上澄みを除去後、RIPA Buffer を加えた。得られたタンパク質溶液をサンプルとし、Bradford Protein Assay を用いてタンパク質定量を行い、タンパク質濃度が 50 μ g/レーンになるようにした。

7)SDS-PAGE

①NuPAGE[®] MOPS SDS Running Buffer 30ml に超純水 570ml を加え、Running Buffer(陽極用)を調製し、同様に NuPAGE[®] MOPS SDS Running Buffer 10ml に超純水 190ml を加えたものに、泳動直前に抗酸化剤 NuPAGE[®] Antioxidant 500 μ l 加えた(陰極用)。

②0.5ml チューブで泳動サンプルと NuPAGE[®] Sample Reducing Agent を混合し、サーマルサイクラーを用いて 70°C、30分加熱した。

③NuPAGE[®] Novex 4-12% Bis-Tris Gel のカセットを超純水で洗浄後、コームを取り外し、Running Buffer で2回洗浄・充填した。

④サンプルおよびマーカー MagicMark[™] XP Western Protein Standard 10 μ l を well に注入した。

⑤陰極用 Running Buffer を内側の泳動層に少し入れ液漏れが無いことを確認し、全量を入れた。

⑥陽極用の Running Buffer を外側の泳動層に入れた。

⑦パワーサプライ MIDI 250 Power Supply MP-250N と接続後、200V、50分で泳動した。

⑧ゲルナイフを用いてカセットからゲルを取りだした。

8)ブロッキング

- ①ゲルトランスファー装置 iBlot Dry Blotting System のプログラム P3 を選んだ。
- ②PVDF 膜 iBlot PVDF Transfer stacks,Mini の陽極スタックのシーリングをはがし、トレイと一緒にゲルトランスファー装置の定位置に載せた。
- ③ゲルをスタックの上に載せ、その上に超純水に浸した iBiot ろ紙を載せ、ローラーを用いて気泡を除いた。
- ④陰極スタックのシーリングをはがし、電極面を上にしてろ紙に載せ、ローラーを用いて気泡を除いた。
- ⑤装置の蓋裏にスポンジを取りつけ、蓋を閉じ7分間ブロッキングを行った。
- ⑥ブロッキング終了後、慎重にスタック、ろ紙、ゲル、PVDF 膜を取りだした。PVDF 膜が乾燥しないように超純水に浸し、すぐに染色を行った。

9)染色

- ①PVDF 膜をブロッキングバッファーに浸し、室温で1時間振とうさせた。
- ②ブロッキングバッファーで希釈した、一次抗体希釈液 Anti-HIF-1 α antibody(ab113642) (1:500)、MONOCLONAL ANTI-BETA-ACTIN antibody produced in mouse(SAB1305554-40TST) (1:1000)をそれぞれ加え、4°Cで一晩、振とうさせ反応させた。
- ③TBST で軽く2回洗浄し、さらに5分×3回 TBST で洗浄を行った。
- ④ブロッキングバッファーで希釈した、二次抗体希釈液 goat anti-mouse IgG-HRP(sc-2005) (1:2000)を加え、室温で1時間、振とうさせ反応させた。さらに5分×3回 TBST で洗浄を行った。
- ⑤PVDF 膜から余分なバッファーを取り除き、Western BLoT Quant HRP Substrate を表面張力を利用し、全体を覆うようにかけた。室温で5分静置し、そのままの状態 で化学発光検出機を用いて測定した。

10)ImageJによるバンドピークの半定量化

ImageJは、アメリカ国立衛生研究所 (NIH) で開発された画像解析ソフトウェアで、本実験で得られたウエスタンブロット画像はこのソフトウェアを用いて解析を行った。同じ範囲で指定した HIF-1 α と Actin のそれぞれのバンドピークをピクセル単位で解析し、得られた HIF-1 α の面積を Actin の面積で割り、半定量化を行った。

3-2-10 MDR1 の免疫染色法

1)使用試薬

一次抗体：MDR1/ABCB1 (E1Y7B) Rabbit mAb (#13342)

Cell Signaling TECHNOLOGY

二次抗体：Anti-Rabbit IgG (H+L),F(ab')₂ Fragment (#4412)

Cell Signaling TECHNOLOGY

その他 3-2-8 の 1)を参照

2)使用機器及び器具

3-2-8 の 2)を参照

3)細胞培養

3-2-8 の 4)を参照

4)実験手順

①~③は 3-2-8 の 5)を参照

④一次抗体反応：0.01%TWEEN 20 含有 PBS(-) で洗浄後、一次抗体 MDR1/ABCB1 (E1Y7B) Rabbit mAb (#13342)を 0.01%TWEEN 20 含有 10%ヤギ血清 PBS(-)で 800 分の 1 希釈したものを添加した(2 時間、室温、遮光でインキュベート)。

⑤二次抗体反応：0.01%TWEEN 20 含有 PBS(-)で洗浄後、二次抗体 Anti-Rabbit IgG (H+L),F(ab')₂ Fragment (#4412)を PBS(-)で 250 分の 1 希釈したものを添加した(1 時間、室温、遮光でインキュベート)。

⑥⑦は 3-2-8 の 5)を参照

3-2-11 細胞の RNA 精製

1)使用試薬

2-2-10 の 1)参照

2)使用機器及び器具

浮遊培養用マルチプレート 24 well

住友ペークライト

その他 2-2-10 の 2)参照

3)細胞培養

monolayer 培養では細胞培養用マルチプレート 24 well に細胞数 2.5×10^4 cell/well、spheroid 培養では poly-L-glutamic acid 被覆した浮遊培養用マルチプレート 24 well に細胞数 5.0×10^4 cell/well で播種し、CO₂ インキュベーターで 4 日間培養した。

4)RNA の精製

2-2-10 の 4)参照

3-2-12 Genopal[®] customized Hepatocyte chip の作製方法及び特徴

2-2-11 参照

3-2-13 Genopal[®] customized Hepatocyte chip を用いた遺伝子解析

1)遺伝子解析プロトコル

2-2-12 の 1)参照

3-3 結果と考察

3-3-1 HepG2 細胞の HIF-1 α の共焦点レーザー顕微鏡観察

Fig. 3-5 に、HepG2 細胞の monolayer 培養及び spheroid 培養における HIF-1 α 及び核を染色した蛍光画像を示した。

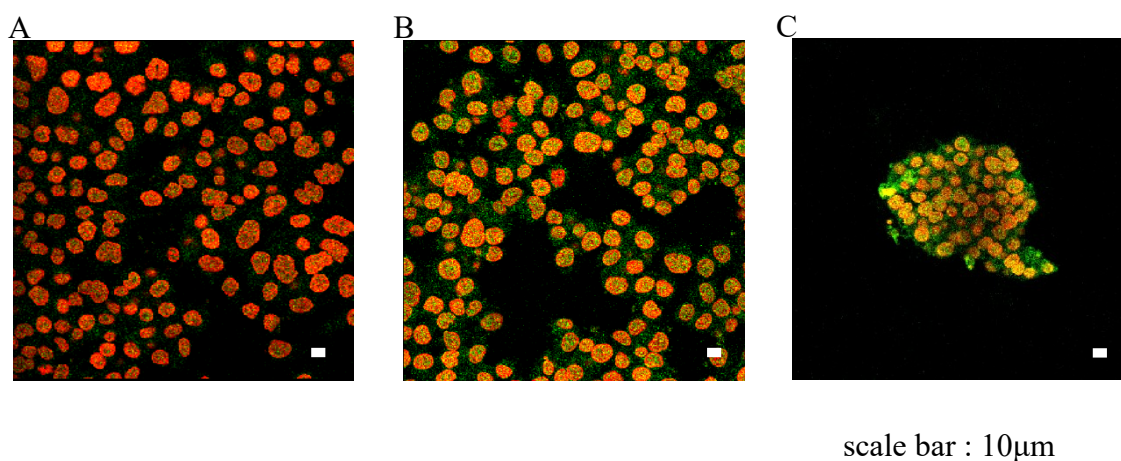


Fig. 3-5 HepG2 細胞の HIF-1 α の蛍光画像(緑:HIF-1 α 赤:核)
(A:monolayer B:CoCl₂ 処理した monolayer C:spheroid)

蛍光画像より、monolayer 培養では、HIF-1 α の存在を示す緑色蛍光がほとんど認められなかった(Fig. 3-5A)。一方、ポジティブコントロールとして塩化コバルト処理した monolayer 培養では緑色蛍光が確認された(Fig. 3-5B)。また、spheroid 培養の HepG2 細胞は、緑色蛍光が観察された(Fig. 3-5C)。これらのことから、spheroid 培養の HepG2 細胞では、monolayer 培養と比べ、HIF-1 α が増大していることが示唆された。

3-3-2 ウェスタンブロットによる HIF-1 α の発現

そこで次に、HIF-1 α の発現量を、monolayer 培養と spheroid 培養で定量的に比較するために、ウェスタンブロット解析を行った。Fig. 3-6 にウェスタンブロットによる HIF-1 α タンパク質の発現を、Fig. 3-7 に ImageJ を用いた画像解析による半定量を行ったものを示した。

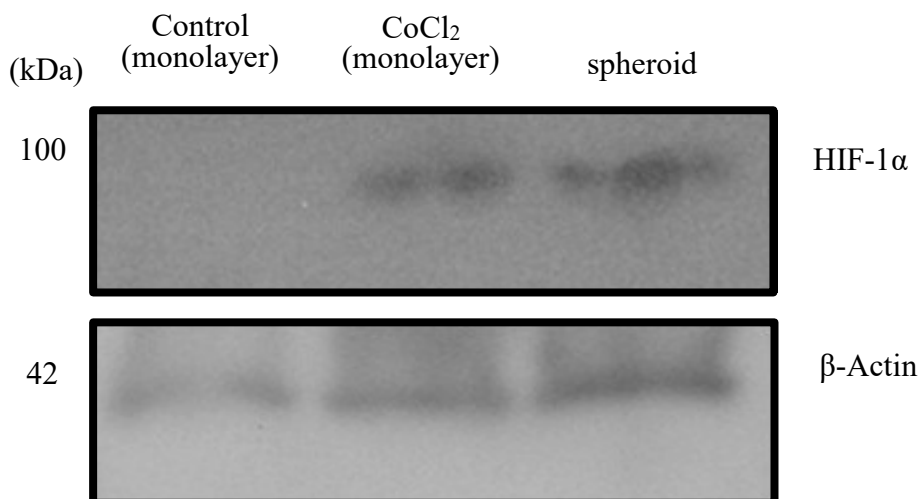


Fig. 3-6 HepG2 細胞の monolayer、spheroid 培養における HIF-1 α タンパク質の発現

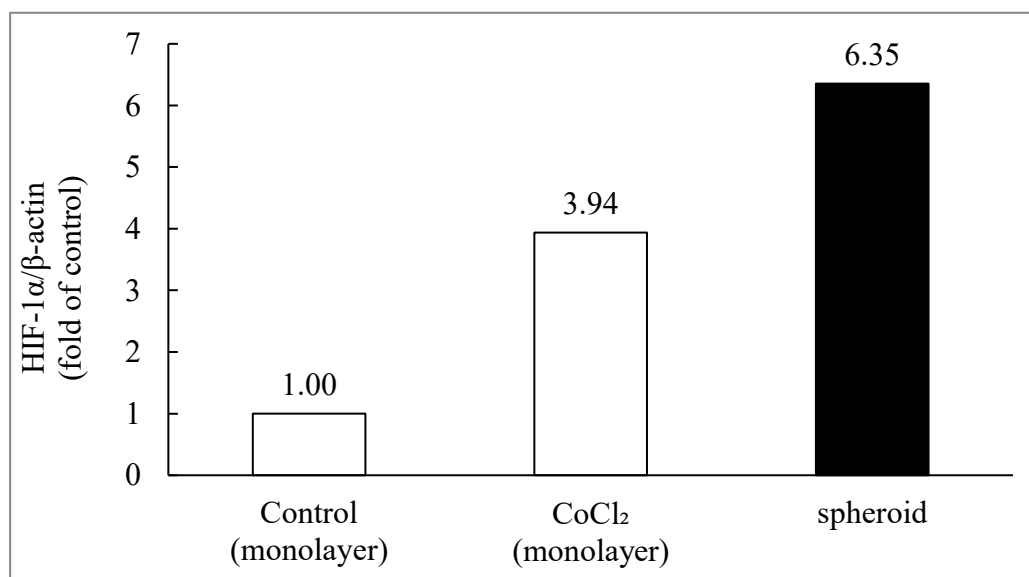


Fig. 3-7 ImageJ を用いた各バンドピークの半定量

ウエスタンブロットにより、塩化コバルト処理した monolayer 培養と spheroid 培養の HepG2 細胞は、約 100kDa³⁶⁾の箇所にバンドが観察された。一方、monolayer 培養では、約 100kDa の箇所にバンドがほとんど観察されなかった(Fig.3-6)。さらに、ImageJ による画像解析の結果、spheroid 培養の HepG2 細胞は、monolayer 培養と比べ、約 6.4 倍の HIF-1 α タンパク質が発現していることが示された(Fig. 3-7)。これらの結果より、spheroid 培養の HepG2 細胞は、monolayer 培養と比べ、HIF-1 α の増大が示唆された。

3-3-3 HepG2 細胞の MDR1 の共焦点レーザー顕微鏡観察

Fig. 3-8 に MDR1 及び核を染色した蛍光画像を示した。

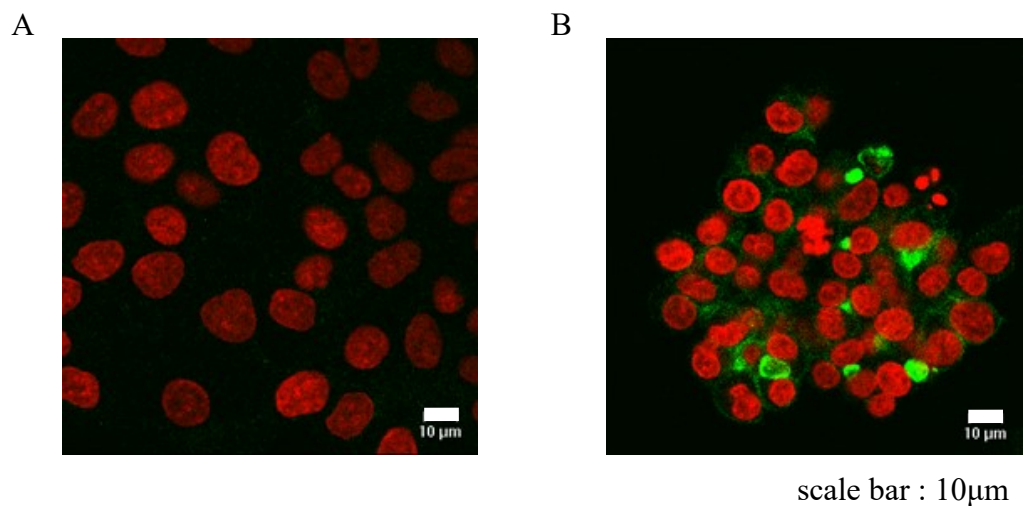


Fig. 3-8 HepG2 細胞の MDR1 蛍光画像(緑:MDR1 赤:核)
(A:monolayer B: spheroid)

HIF-1 α の発現が確認されたため、次に MDR1 についての検討を行ったところ、蛍光画像より、spheroid 培養の HepG2 細胞は、MDR1 の存在を示す緑色蛍光が観察された(Fig. 3-8B)。一方、monolayer 培養では、緑色蛍光がほとんど認められなかった(Fig. 3-8A)。このことから、spheroid 培養の HepG2 細胞は、monolayer 培養と比べ、MDR1 の増大が示唆された。

3-3-4 各培養条件での HepG2 細胞の遺伝子解析

Genopal[®] customized Hepatocyte chip による遺伝子解析の発現比を Fig. 3-9 に示した。

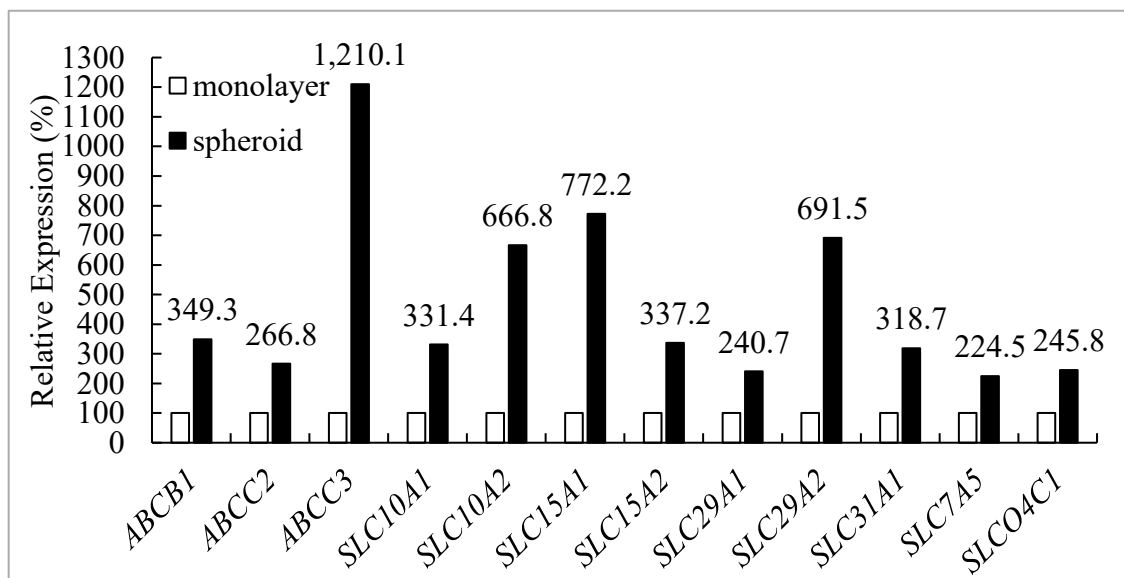


Fig. 3-9 各培養条件での HepG2 細胞の遺伝子の発現比

HepG2 細胞を spheroid 培養することにより、monolayer 培養に比べてトランスポーター系の遺伝子の発現が上昇し、MDR1(*ABCB1*)は約 3.5 倍の発現上昇が確認された。

3-4 総括

近年、このがん細胞による薬剤排出活性の亢進に、三次元組織形成が関与していることが報告され²⁸⁾、三次元化と薬剤耐性の関連について注目されている。特に MDR1 は、がん組織内が低酸素状態になることによって、低酸素誘導性転写因子である HIF-1 が応答することで、発現が亢進することが報告されている²⁹⁻³³⁾。

本章では、MDR1 の転写因子として知られている HIF-1 α の関与について、共焦点レーザー顕微鏡観察やウエスタンブロット解析により検討した。また、肝細胞に関する遺伝子の発現量を測定する Genopal[®] customized Hepatocyte chip を用いて、spheroid 培養が肝がん細胞に与える MDR1 遺伝子等への影響を評価し、次のような結果が得られた。

免疫染色においては、monolayer 培養のコントロールに比べ spheroid 培養の方が HIF-1 α の発現が多く見られた。さらにウエスタンブロットによる HIF-1 α 発現の比較により spheroid 培養では、約 100kDa の箇所にバンドが観察されたが、monolayer 培養では、バンドがほとんど観察されなかった。また、ImageJ による画像解析の結果より、spheroid 培養の HepG2 細胞は、monolayer 培養と比べ、約 6.4 倍の HIF-1 α タンパク質が発現していることが示された。これらの結果より、spheroid 培養の HepG2 細胞は、monolayer 培養と比べ、HIF-1 α の増大が示唆された。

また、薬剤排出活性タンパク質である MDR1 の発現を同じく免疫染色で解析した所、spheroid 培養は monolayer 培養に比べて顕著な増大が確認され、一部 MDR1 が局在している箇所がみられた。これまでの知見により、肝細胞を spheroid 培養することで、細胞集塊内に胆管様構造が形成されるなど、生体内に近い組織構造の形成を伴っている事が知られており⁷⁴⁾、肝細胞内の MDR1 は胆管側膜に局在し、細胞を三次元培養することによって MDR1 や MRP2 が局在している部分で胆管の形成を示唆している報告がある^{98,99)}。本研究においても MDR1 の局在が確認されたため胆管の形成が示唆され、より生体内の環境を再現できた可能性が考えられる。

Genopal[®] customized Hepatocyte chip の遺伝子解析の結果より、spheroid 培養では主に 9 つの SLC トランスポーター群の遺伝子が上昇し、薬剤排出活性タンパク質である MDR1(ABCB1)の発現量は、monolayer 培養と比べて約 3.5 倍高い発現が確認された。薬剤排出活性タンパク質である MDR1 や薬剤排出に関わるトランスポーター群の遺伝子の上昇により、生体内の薬剤耐性を再現できたと考えられる。

これらの結果より spheroid 培養は生体内のがん組織と同じように三次元形成

に伴ったがん組織内部のMDR1の働きを *in vitro* で模倣できることが示唆された。したがって、spheroid 培養を用いた培養系は、生体内のがん細胞の薬剤耐性を再現し、新規薬剤耐性克服薬のスクリーニング系として有用であることが示唆された。

第4章 培養担体 Cellbed®を用いて三次元培養させた HepG2 細胞の薬剤耐性現象の解析

4-1 序

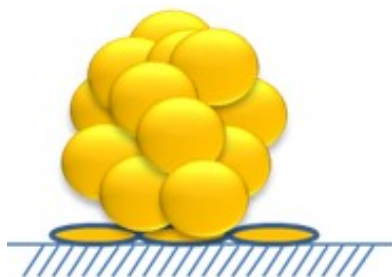
がん細胞は、薬剤排出活性などが高まることで薬剤耐性を獲得していることが確認されており、この薬剤耐性を克服することが、がん治療の課題の一つである。第1章で述べたように、がん細胞の薬剤耐性を克服するためには、生体内のがん細胞の薬剤耐性を *in vitro* で再現することが重要であり、これまでの制がん剤のスクリーニングは、主に二次元培養で行われてきたため、がん細胞の薬剤耐性を完全に再現できていないと考えられている。さらに薬剤排出活性の獲得には、三次元組織形成が関与していることが指摘されており²⁸⁾、現在そのメカニズムについて検討されている。

現在、本研究室で用いられている spheroid 培養法以外にも、様々な三次元培養法が確立されており、細胞積層化技術、磁力を用いた細胞の三次元組織化、3D バイオプリンター、細胞積層法、細胞集積法などの方法がある⁸¹⁾。

今回、この中でも、細胞積層技術の培養方法である Cellbed®を用いて、*in vitro* での検討を行った。第2章でも述べたように、Cellbed®は高純度のシリカファイバーからなる三次元培養基材であり、Cellbed®培養では均一な細胞層が形成される。さらに、他の培養法と比べ、比較的簡便に細胞の三次元培養が可能となっている。本研究室で用いられている spheroid 培養法は HepG2 細胞の薬剤耐性の原因の一つである細胞の高い排出活性と MDR1 タンパクを生体外で発現させることに成功している⁸⁰⁾。しかしながら、spheroid 培養を増殖性のあるがん細胞に適用する場合、その粒径のコントロールが難しく、播種密度が高すぎたり、培養期間が長すぎると、spheroid 直径が大きくなりすぎ、内部にネクロシスを起こす場合がある。また、形成される spheroid の粒径を揃えることにも難しさがある¹⁰⁰⁾。

その点、細胞積層型の三次元培養では、細胞が球状集塊にはならず、平面の積層三次元となるため、層の厚みを、より均一に制御しやすい可能性があると思われる(Fig. 4-1)。そこで本研究では、細胞積層型の三次元培養の一種である Cellbed®培養において、薬剤耐性の発現が可能かどうかの検討を行った。

spheroid 培養



粒径のコントロールが難しい

Cellbed®培養(細胞積層型)



細胞の厚みをコントロールしやすい

Fig. 4-1 Cellbed®培養によるがん細胞の三次元培養

本章では、Cellbed®培養における肝がん細胞の薬剤耐性現象について検討を行った。また、MDR1の転写因子として知られているHIF-1 α の関与について、共焦点レーザー顕微鏡観察やウエスタンブロット解析により検討した。さらに、肝細胞に関する遺伝子の発現量を測定するGenopal® customized Hepatocyte chipを用いて、Cellbed®培養が肝がん細胞に与えるMDR1遺伝子等への影響を評価した。

4-2 実験方法

4-2-1 使用細胞、使用試薬、器具及び機器

1)使用細胞

3-2-1 の 1)参照

2)使用試薬

2-2-1 の 2)及び 3-2-1 の 2)参照

3)使用機器及び器具

細胞培養用マルチプレート 96 well

Cellbed[®] 96 well plate

2-2-1 の 3)及び 3-2-1 の 3)参照

住友ベークライト

日本バイリーン

4-2-2 試薬の調製法

1)培地の種類

ヒト肝臓がん由来細胞(HepG2)を増殖させるには、増殖用培地 MEM(Minimum Essential Medium)を用いた。

2)使用培地の組成

3-2-2 の 2)参照

3)調製法

4-2-3 滅菌法

2-2-3 参照

4-2-4 細胞の計数法

2-2-4 参照

4-2-5 細胞の融解法及び凍結法

3-2-5 参照

4-2-6 細胞の継代法

3-2-6 参照

4-2-7 Cellbed[®]の作製方法及び特徴

2-2-7参照

4-2-8 Cellbed[®]の実験前処理及びHepG2細胞の培養

1) Cellbed[®]の実験前処理

2-2-8の1)参照

2) HepG2細胞の培養

細胞の播種は3-2-6の1)の細胞増殖を目的とした継代の遠心操作まで同様に行った。2-2-8の1)の実験前処理を行ったCellbed[®] 24 well plateに 3.0×10^5 cell/wellで播種し(Cellbed[®] 96 well plateの場合は播種密度 5.0×10^4 cell/well)、37°C、CO₂濃度5.0%、水蒸気飽和に保たれたインキュベーターに入れて、細胞を培養した。その後、48hごとに増殖用培地MEMで培地交換を行い、7日間培養を行った。

4-2-9 走査型電子顕微鏡(SEM)による細胞及び Cellbed[®]の観察

2-2-9 参照

4-2-10 アクチン及び核の二重染色法

1)使用試薬

Rhodamine Phalloidin

Slow Fade

その他 3-2-8 の 1)参照

Invitrogen
Life Technologies

2)使用機器及び器具

3-2-9 の 2)参照

3)試薬の調整法

①Rhodamine Phalloidin/methanol の調製法

Rhodamine Phalloidin を methanol で $6.6\mu\text{M}$ になるように調製し、 -20°C で保存した。

4)細胞培養

4-2-8 の 2)参照

5)実験手順

①固定

3-2-9 の 5)参照。

②洗浄

固定液を吸引除去し、PBS(-)による洗浄を 2 回行った。

③染色

PBS(-)で洗浄後、TO-PRO3 を $2\mu\text{M}$ 、Rhodamine Phalloidin を $0.165\mu\text{M}$ に希釈させた PBS(-)を添加した(30 分間、室温、遮光でインキュベート)。

④洗浄

染色液を吸引除去し、PBS(-)による洗浄を 2 回行った。

⑤観察

染色後、封入剤(Slow Fade)を数滴添加し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察を行った(共焦点レーザー顕微鏡の波長は Rhodamine Phalloidin : $554\sim 573\text{nm}$ および TO-PRO-3 : $642\sim 661\text{nm}$)。

4-2-11 DOX の 50%増殖抑制試験(IC₅₀ 値の測定)

1)使用試薬

①制がん剤

ドキソルビシン塩酸塩(DOX)(MW:579.99)

和光純薬工業

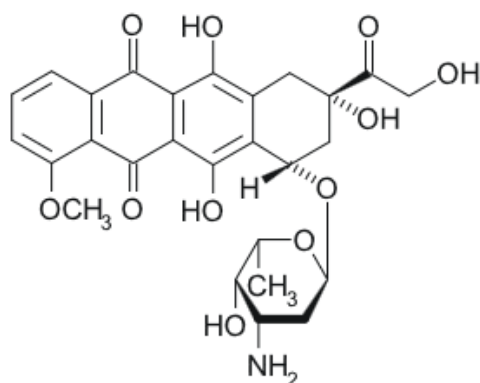


Fig.4-2 DOX の構造式

Verapamil(MW:454.602)

和光純薬工業

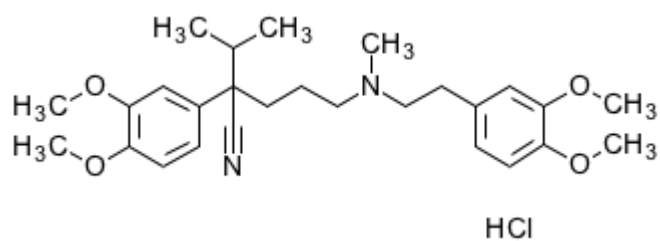


Fig. 4-3 Verapamil の構造式

②DOX の 50%増殖抑制濃度(IC₅₀ 値)の測定に必要な試薬

Cell Counting Kit-8

DOJINDO

その他 2-2-1 の 2)及び 3-2-1 の 2)参照

2)使用機器及び器具

2-2-1 の 3)及び 3-2-1 の 3)参照

3)調製法

①DOX の調製法

ドキソルビシン塩酸塩を測り取り滅菌水で 10mM になるよう調製し、0.22 μ m 濾過滅菌フィルターで濾過滅菌したものを各最終濃度(0.1 μ M \sim 300 μ M)になるよう調製した。

②Verapamil の調製法

Verapamil を測り取り滅菌水で 1mM になるよう調製し、0.22 μ m 濾過滅菌フィルターで濾過滅菌したものを各最終濃度 100 μ M になるよう調製した。

4) Cell Counting Kit-8 の原理と操作方法

Cell Counting Kit-8(WST-8)の原理図を Fig. 4-4、Fig. 4-5 に示した。WST-8(2-[2-methoxy-4-nitrophenyl]-3-[4-nitrophenyl]-5-[2,4-disulfophenyl]-2H-5-tetrazolium, Monosodium salt)は、生細胞内に取り込まれるとミトコンドリアの脱水素酵素(dehydrogenase)によって WST-8 Formazan に還元される。生細胞数と WST-8 Formazan の量は直線的な比例 関係にあるので、WST-8 Formazan の吸光度($\lambda=460\text{nm}$)から、下記の式により細胞増殖抑制率を求めることが出来る。

$$\text{細胞増殖抑制率 (\%)} = [1 - (A_{\text{Mean}}/A_{\text{control}})] \times 100$$

A_{Mean} : DOX が存在する条件における WST-8 Formazan の吸光度

A_{Control} : DOX が存在しない条件における WST-8 Formazan の吸光度

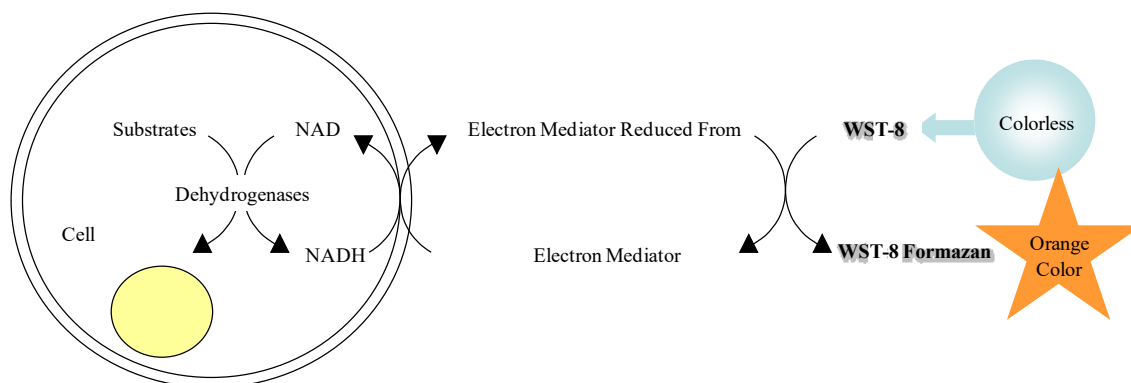


Fig. 4-4 Cell Counting Kit-8 の原理

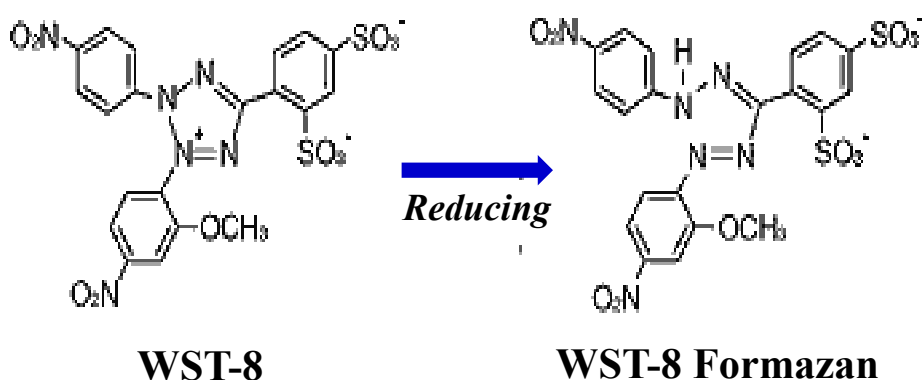


Fig. 4-5 WST-8 の構造式

5)細胞培養

monolayer 培養では、細胞を細胞培養用マルチプレート 96 well に 2000 cell/well で播種し、Cellbed[®]培養は、Cellbed[®] 96 well plate に 5.0×10^4 cell/well で播種を行い、前培養を行った。Monolayer 培養及び Cellbed[®]培養の前培養はともに 7 日間培養とした。前培養後、DOX($0.1 \mu\text{M} \sim 300 \mu\text{M}$)及び $100 \mu\text{M}$ Verapamil を添加し、48 時間処理後、培養培地の吸引除去を行い、新鮮培地 : WST-8 = $180 \mu\text{l} : 20 \mu\text{l}$ を各 well へ添加し、反応時間 30min で上澄みを $100 \mu\text{l}/\text{well}$ 回収した。回収した上澄みを測定用の空の 96well multi plate へ移し、吸光度の測定を行った。IC₅₀ 値は、WST-8 により評価した。

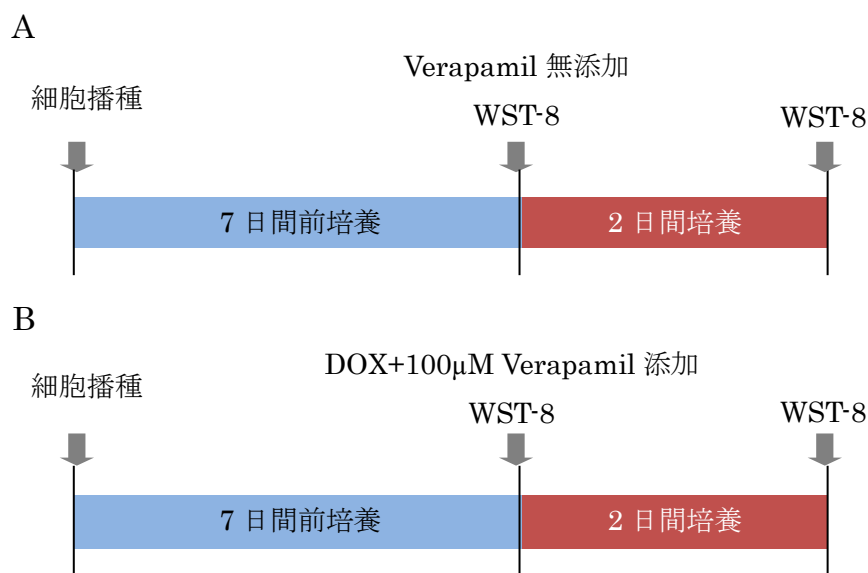


Fig. 4-6 DOX による IC₅₀ 値の測定スケジュール
(A: Verapamil 無添加条件 B: Verapamil 添加条件)

4-2-12 HIF-1 α の免疫染色法

1)使用試薬

Slow Fade

Life Technologies

その他 3-2-8 の 1)参照

2)使用機器及び器具

3-2-8 の 2)参照

3)細胞培養

monolayer 培養では、HepG2 細胞を、glass bottom dish(ϕ 35mm)に 2.0×10^4 cell/dish で播種し、Cellbed[®]培養は、Cellbed[®] 24 well plate に 3.0×10^5 cell/well で播種し、それぞれ 7 日間培養を行った。

4)実験手順

3-2-8 の 5)参照、ただし、核染色後、Cellbed[®]をピンセットで取り出しカバーガラス上に静置し、封入剤(Slow Fade)を数滴添加した。

4-2-13 HIF-1 α のウェスタンブロット法

1)使用試薬

3-2-9 の 1)参照

2)使用機器及び器具

3-2-9 の 2)参照

3)使用ソフトウェア

3-2-9 の 3)参照

4)タンパク質の定量(Bradford Protein Assay)

3-2-9 の 4)参照

5)細胞培養

monolayer 培養では、HepG2 細胞を、10cm dish に 2.0×10^5 cell/dish で播種し、Cellbed[®]培養は、24 well plate に 3.0×10^5 cells/dish で播種し、7日間培養を行った。

6)SDS-PAGE サンプル調製

monolayer 培養した細胞はセルスクレーパーで回収し、2000rpm で1分間遠心し、上澄みを除去後、RIPA Buffer を加えた。Cellbed[®]培養は、RIPA Buffer が1ml 入った 35ml dish に Cellbed[®]そのものを浸し、1分間程度 Cellbed[®]を RIPA Buffer 中で攪拌した。得られたタンパク質溶液をサンプルとし、Bradford Protein Assay を用いてタンパク質定量を行い、タンパク質濃度が 50 μ g/レーンになるようにした。

7)SDS-PAGE

3-2-9 の 7)参照

8)ブロッティング

3-2-9 の 8)参照

9)染色

3-2-9 の 9)参照

10) ImageJ によるバンドピークの半定量化

3-2-9 の 10)参照

4-2-14 MDR1 の免疫染色法

1)使用試薬

3-2-8 の 1)及び 3-2-10 の 1)を参照

2)使用機器及び器具

3-2-8 の 2)を参照

3)細胞培養

4-2-12 の 3)を参照

4)実験手順

3-2-10 の 4)参照、ただし、核染色後、Cellbed[®]をピンセットで取り出しカバーガラス上に静置し、封入剤(Slow Fade)を数滴添加した。

4-2-13 細胞の RNA 精製

1)使用試薬及び使用機器

2-2-10 の 1)参照

2)使用機器

2-2-10 の 2)参照

3)細胞培養

monolayer 培養では細胞を細胞培養用マルチプレート 24 well に 1.2×10^4 cell/well、Cellbed[®]培養では Cellbed[®] 24 well plate に 3.0×10^5 cell/well で播種し、CO₂ インキュベーターで7日間培養した。

4)RNA の精製

2-2-10 の 4)参照

4-2-14 Genopal[®] customized Hepatocyte chip の作製方法及び特徴

2-2-11 参照

4-2-15 Genopal[®] customized Hepatocyte chip を用いた遺伝子解析

2-2-12 参照

4-3 結果と考察

4-3-1 培養終了後の SEM による形態観察

Fig. 4-7 に Cellbed[®]培養した HepG2 細胞の SEM 写真を示した。

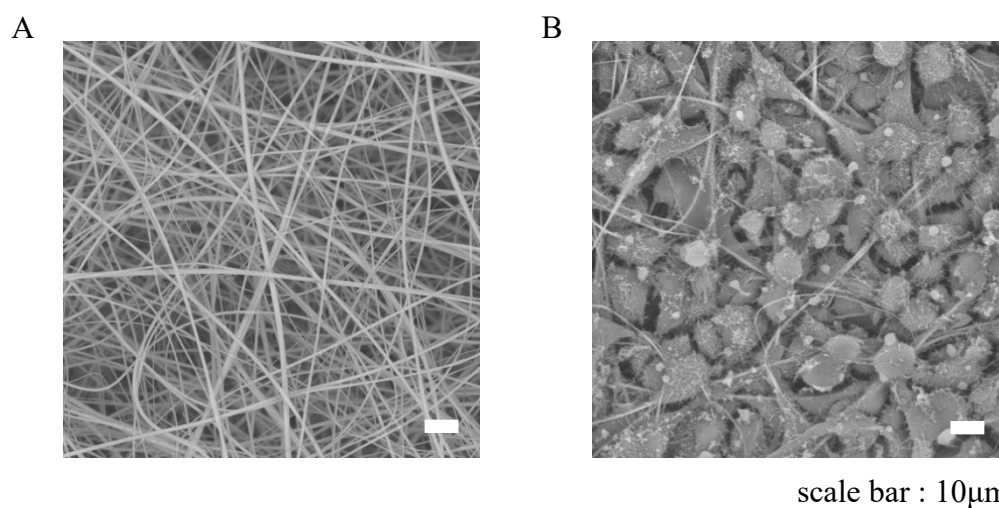


Fig. 4-7 Cellbed[®]培養した HepG2 細胞 SEM 観察画像(A:細胞なし B:培養 9 日目)

Cellbed[®]で 9 日間培養した細胞がシリカファイバーに接着し、細胞層を形成している様子が観察された。また多くは、シリカファイバー内部に存在しているように思われた。

4-3-2 HepG2 細胞のアクチン及び核の共焦点レーザー顕微鏡観察

Fig. 4-8 にアクチン及び核を染色した Cellbed®培養した HepG2 細胞の蛍光画像を示した。

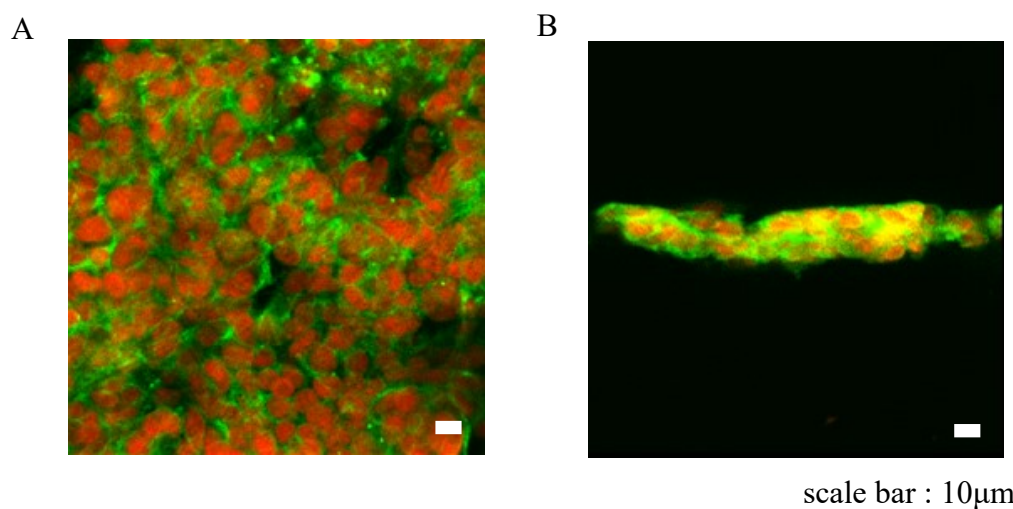


Fig. 4-8 Cellbed®培養した HepG2 細胞の蛍光画像(緑:アクチン 赤:核)
(A:表面 B:断面)

Cellbed®培養した HepG2 細胞の断面の蛍光画像からも細胞層が形成されていることが確認された(Fig. 4-8B)。この播種条件と培養期間だと、細胞層は約3～4層程度と考えられる。

4-3-3 Cellbed®培養を用いた HepG2 細胞に対する 50%増殖抑制試験(IC₅₀ 値)

Fig. 4-9 に Cellbed®培養した HepG2 細胞に対する DOX の IC₅₀ 値の結果を示した。

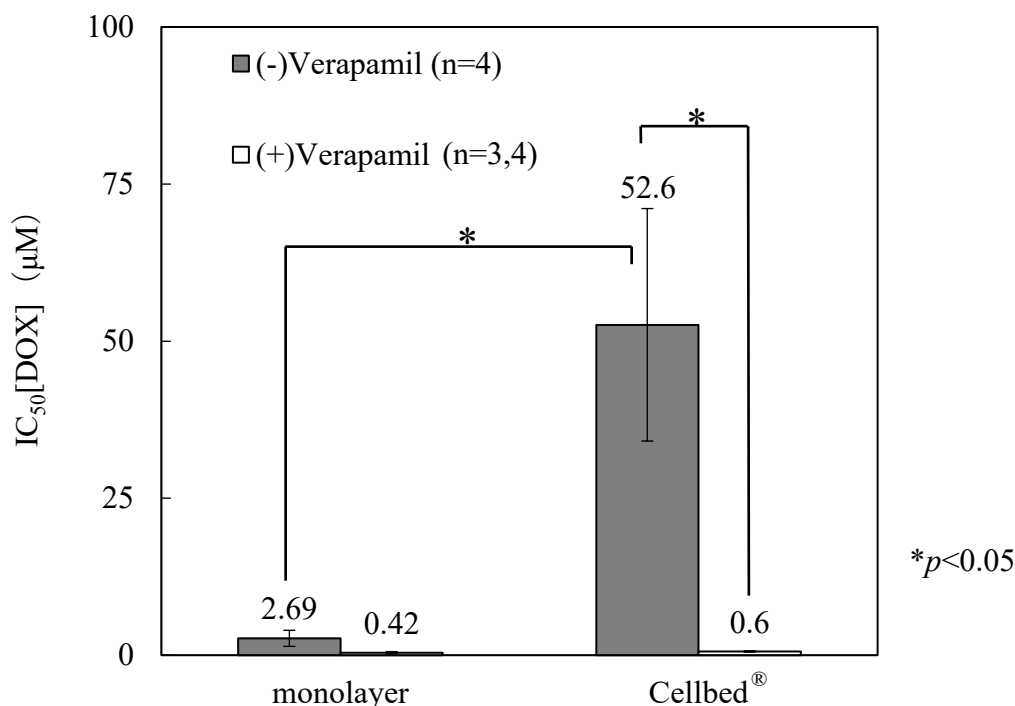


Fig. 4-9 HepG2 細胞の monolayer 培養、Cellbed®培養における IC₅₀ 値の比較

Cellbed®培養の DOX の IC₅₀ 値は、monolayer 培養に比べ、約 20 倍と高い値を示し、IC₅₀ 値は Cellbed®培養で 52.6μM、monolayer 培養で 2.69μM となった。これらの結果より、Cellbed®培養は、monolayer 培養と比べ高い薬剤耐性を発現することが示唆された。

また、MDR1 阻害剤である Verapamil を併用した条件では、Cellbed®培養の DOX の IC₅₀ 値は、0.6μM と有意に阻害され、monolayer 培養の 0.42μM とほぼ同等の値を示した。

この発現が確認された薬剤耐性は MDR1 阻害剤である Verapamil により阻害され、より低濃度の DOX で細胞増殖が抑制されたため、MDR1 の関与の可能性が示された。

4-3-4 HepG2 細胞の HIF-1 α の共焦点レーザー顕微鏡観察

Fig. 4-10 に HepG2 細胞の monolayer 培養及び Cellbed[®]培養における HIF-1 α 及び核を染色した蛍光画像を示した。

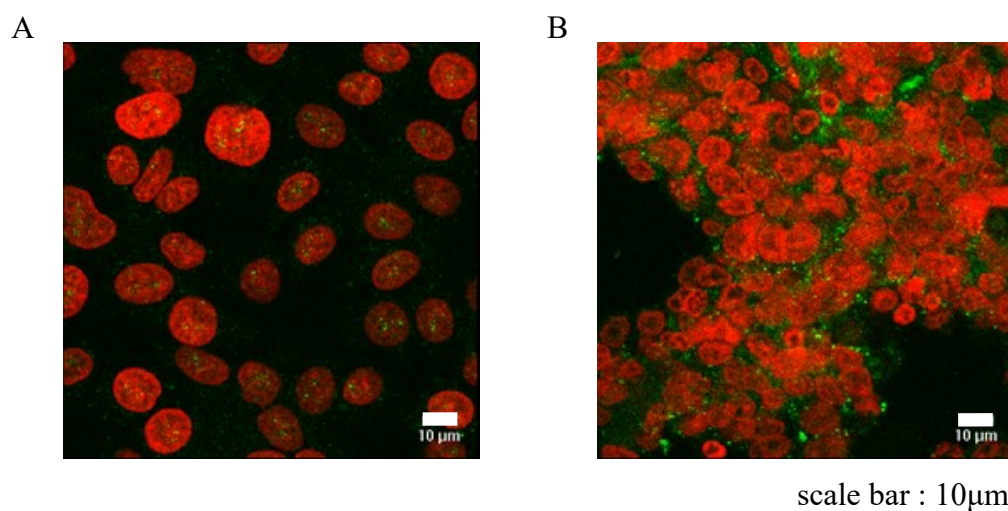


Fig. 4-10 HepG2 細胞の HIF-1 α 蛍光画像(緑:HIF-1 α 赤:核)
(A:monolayer B: Cellbed[®])

MDR1 の関与について、MDR1 の転写因子である HIF-1 α について検討を行った。蛍光画像より、Cellbed[®]培養の HepG2 細胞は、HIF-1 α の存在を示す緑色蛍光が観察された(Fig. 4-10B)。一方、monolayer 培養では、緑色蛍光がほとんど認められなかった(Fig. 4-10A)。このことから、Cellbed[®]培養の HepG2 細胞は、monolayer 培養と比べ、HIF-1 α が増大していることが示唆された。

4-3-5 ウェスタンブロットによる HIF-1 α の発現

次に、HIF-1 α の発現量を、monolayer 培養と Cellbed[®]培養で定量的に比較するために、ウェスタンブロット解析を行った。Fig. 4-11 にウェスタンブロットによる HIF-1 α タンパク質の発現を、Fig. 4-12 に ImageJ を用いた画像解析による半定量を行ったものを示した。

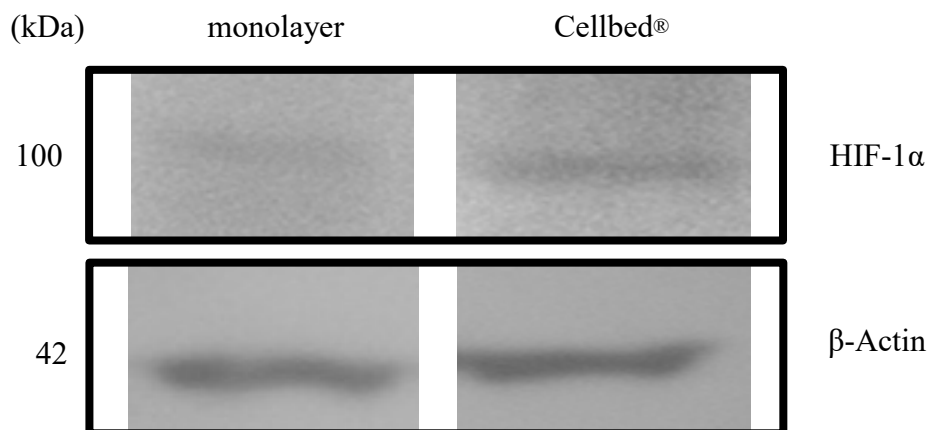


Fig. 4-11 HepG2 細胞の monolayer、Cellbed[®]培養における HIF-1 α タンパク質の発現

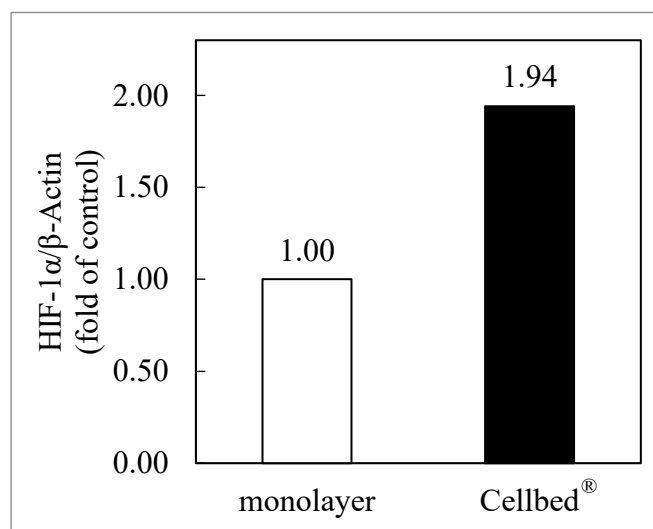


Fig. 4-12 ImageJ を用いた各バンドピークの半定量

ウエスタンブロットにより、Cellbed[®]培養の HepG2 細胞は、約 100kDa の箇所バンドが観察された。一方、monolayer 培養では、約 100kDa の箇所バンドがほとんど観察されなかった(Fig.4-11)。また、どちらも β -アクチンのバンドには大きな差は見られなかった。さらに、ImageJ による画像解析の結果、Cellbed[®]培養の HepG2 細胞は、monolayer 培養と比べ、約 1.9 倍の HIF-1 α タンパク質が発現していることが示された(Fig. 4-12)。これらの結果より、Cellbed[®]培養の HepG2 細胞は、monolayer 培養と比べ、HIF-1 α の増大が示唆された。

4-3-6 HepG2 細胞の MDR1 の共焦点レーザー顕微鏡観察

Fig. 4-13 に MDR1 及び核を染色した蛍光画像を示した。

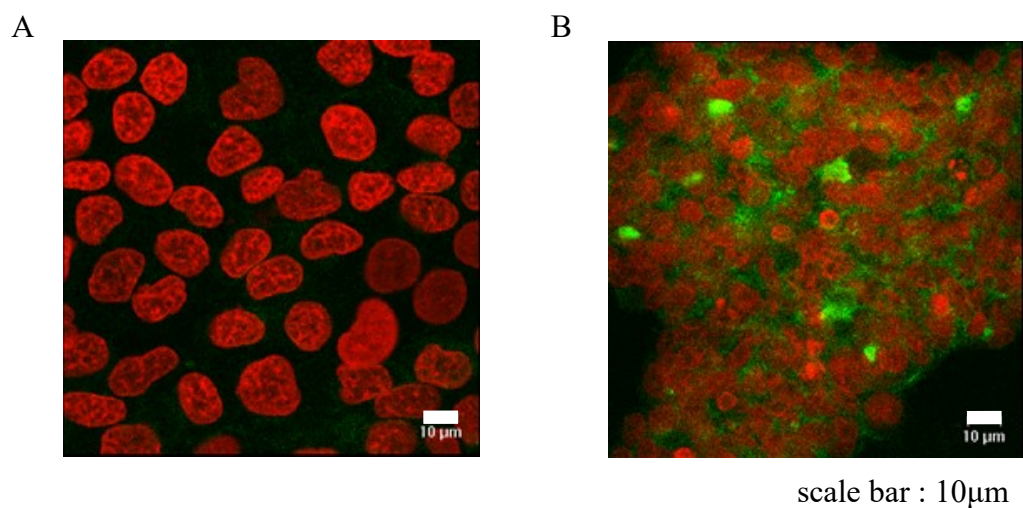


Fig. 4-13 HepG2 細胞の MDR1 蛍光画像(緑:MDR1 赤:核)
(A:monolayer B: Cellbed®)

HIF-1 α の発現が確認されたため、次に MDR1 についての検討を行ったところ、蛍光画像より、Cellbed®培養の HepG2 細胞は、MDR1 の存在を示す緑色蛍光が観察された(Fig. 4-13B)。一方、monolayer 培養では、緑色蛍光がほとんど認められなかった(Fig. 4-13A)。このことから、Cellbed®培養の HepG2 細胞は、monolayer 培養と比べ、MDR1 の増大が示唆された。

4-3-7 同条件での HepG2 細胞の scatter plot 解析

monolayer 培養で 168 時間培養した条件の HepG2 細胞から得られた Genopal[®] customized Hepatocyte chip の結果より scatter plot を作成し、Fig. 4-14 に示した。

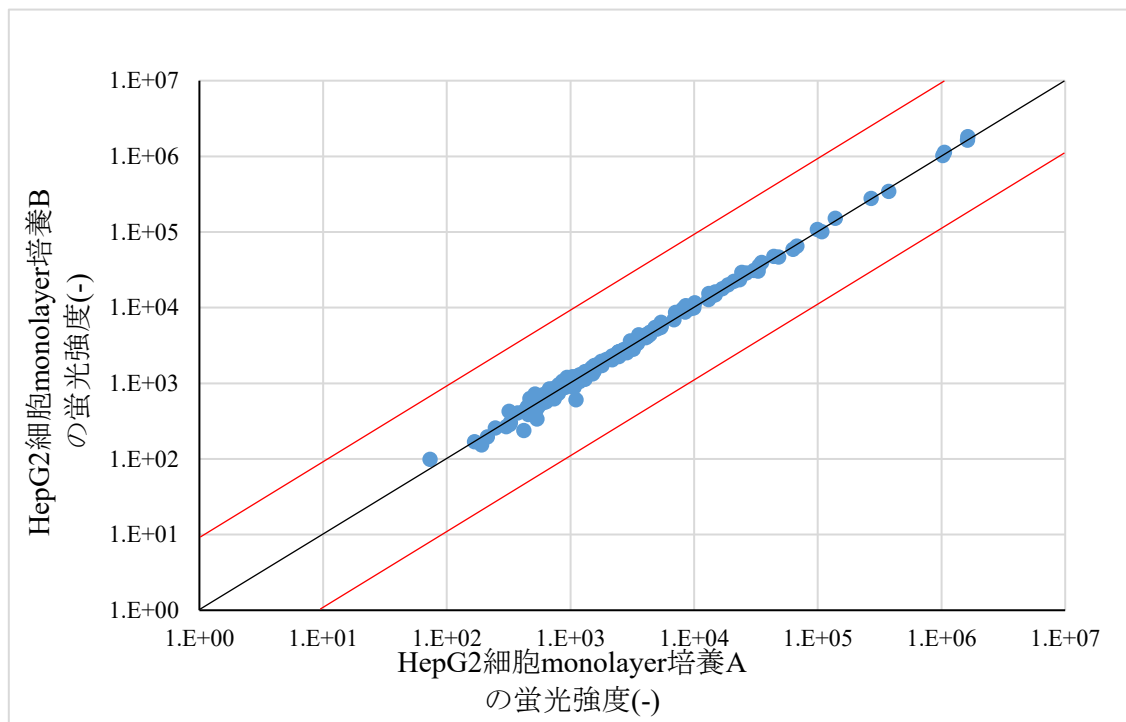


Fig. 4-14 同条件での HepG2 細胞 monolayer 培養での発現遺伝子の scatter plot

同条件の HepG2 細胞の発現遺伝子の測定結果より作成された scatter plot から正の相関関係が得られ、Genopal[®] customized Hepatocyte chip の再現性が示唆された。

Cellbed®培養で 168 時間培養した条件の HepG2 細胞から得られた Genopal® customized Hepatocyte chip の結果より scatter plot を作成し、Fig. 4-15 に示した。

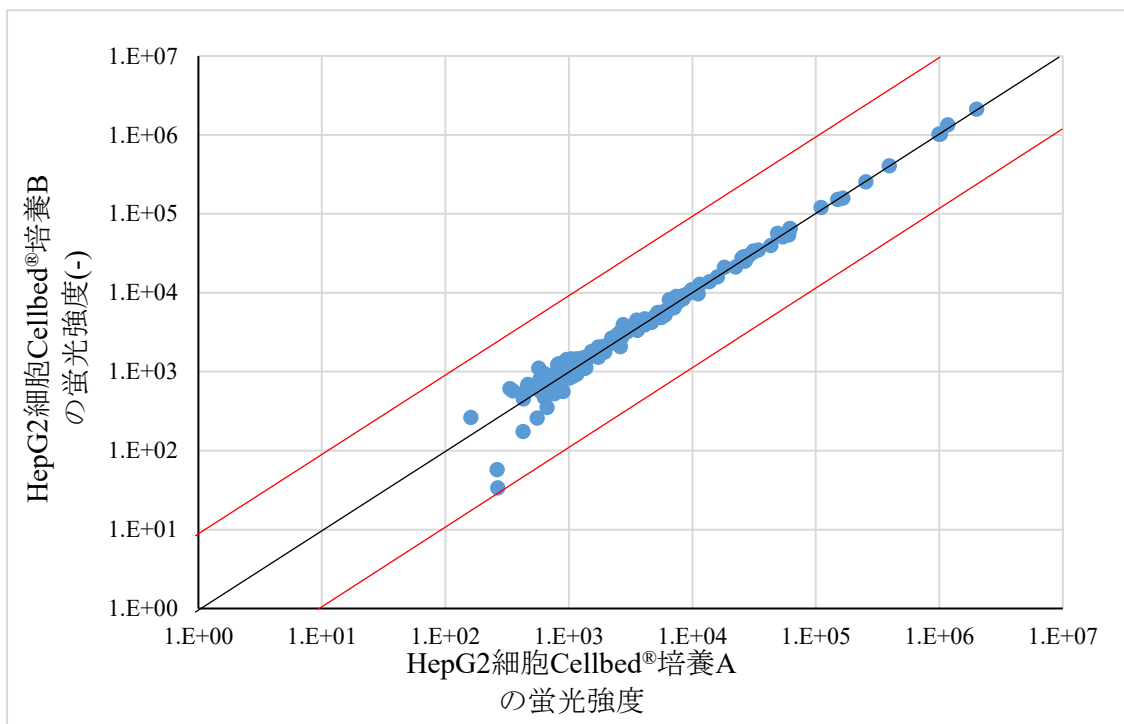


Fig. 4-15 同条件での HepG2 細胞 Cellbed®培養での発現遺伝子の scatter plot

Cellbed®培養の測定結果より作成された scatter plot においても正の相関関係が得られ、Genopal® customized Hepatocyte chip の再現性が示唆された。

これらの結果より同じ培養条件のサンプルにおいて Genopal® customized Hepatocyte chip は高い再現性を持つことが示唆され、Cellbed®培養は遺伝子解析において、異なる well でも再現性の高い安定したサンプルが得られることが確認された。

4-3-8 各培養条件での HepG2 細胞の遺伝子解析

Genopal[®] customized Hepatocyte chip による遺伝子解析の発現比を Fig. 4-16 に示した。

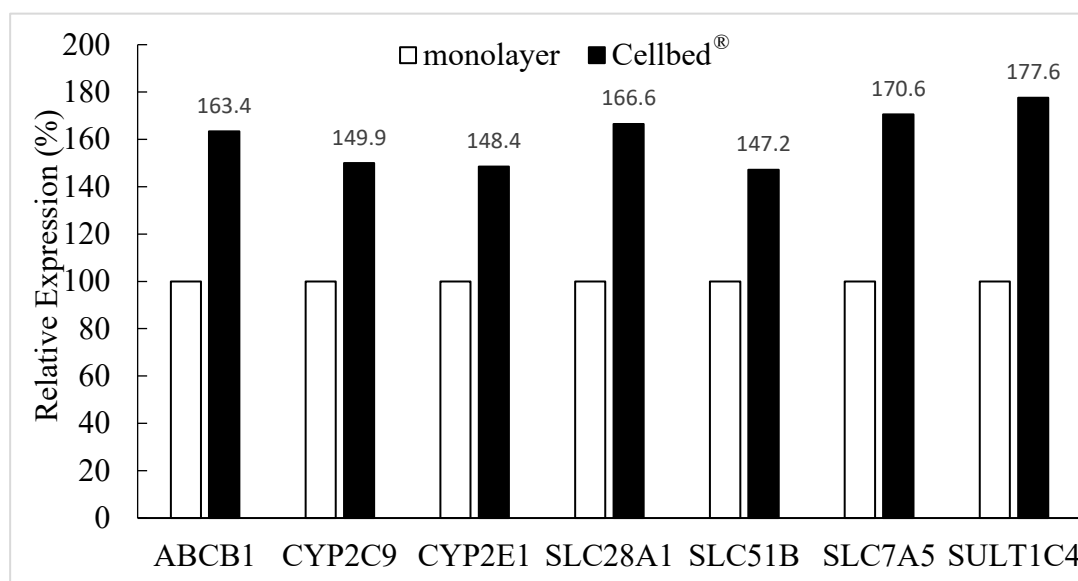


Fig. 4-16 各培養条件での HepG2 細胞の遺伝子の発現比

HepG2 細胞を Cellbed[®]培養することにより、monolayer 培養に比べてトランスポーター系の遺伝子の発現が上昇し、MDR1(ABCB1)は約 1.6 倍の発現上昇が確認された。

4-4 総括

これまで本研究室では第3章で述べたように、本研究室独自の spheroid 培養を基に薬剤耐性試験を行ってきた。近年、様々な三次元培養法が各メーカーから新たに開発されている。しかし、未だ万能と呼べる三次元培養法は確立されておらず、用法を固定し、特化したものが多い。

本章では、Cellbed®培養における HepG2 細胞の薬剤耐性について検討を行った。また、MDR1 の転写因子として知られている HIF-1 α の関与について、共焦点レーザー顕微鏡観察やウエスタンブロット解析により検討した。さらに、肝細胞に関する遺伝子の発現量を測定する Genopal® customized Hepatocyte chip を用いて、Cellbed®培養が肝がん細胞に与える MDR1 遺伝子への影響を評価し、次のような結果が得られた。

SEM(data not shown)やアクチン染色による断面の画像により、Cellbed®培養を用いた HepG2 細胞は均一な 3~4 層の細胞層を形成していることが確認された。

DOX に対する 50%増殖抑制試験において、Cellbed®培養は、monolayer 培養と比べ、IC₅₀ 値が約 20 倍と有意に高い値を示し、抗がん剤である DOX に対する薬剤耐性現象を生体外で発現することが明らかとなった。また、この薬剤耐性が MDR1 を阻害する Verapamil により有意に阻害されたため、この薬剤耐性現象には、MDR1 が関与している可能性が示された。

そこで MDR1 タンパク質の発現を制御する転写因子である、HIF-1 α の発現を免疫染色で確認した所、monolayer 培養のコントロールに比べ Cellbed®培養の方が HIF-1 α の発現が多く見られた。さらにウエスタンブロットによる HIF-1 α 発現の比較により Cellbed®培養の HepG2 細胞は、約 100kDa の箇所にバンドが観察されたが、monolayer 培養では、約 100kDa の箇所にバンドがほとんど観察されなかった。また、ImageJ による画像解析の結果より、Cellbed®培養の HepG2 細胞は、monolayer 培養と比べ、約 1.5 倍の HIF-1 α タンパク質が発現していることが示された。これらの結果より、Cellbed®培養の HepG2 細胞は、monolayer 培養と比べ、HIF-1 α の増大が示唆された。

薬剤排出活性タンパク質である MDR1 の発現を同じく免疫染色で解析した所、Cellbed®培養は monolayer 培養に比べて顕著な増大が確認された。さらに、Cellbed®培養においても第3章の結果と同様に MDR1 が局在している箇所が確認されたため、胆管の形成が示唆された^{98,99)}。

Genopal® customized Hepatocyte chip の遺伝子解析の結果より、Cellbed®培養では薬剤排出活性タンパク質である MDR1(ABCB1)の発現量が、monolayer 培養と比べて約 1.6 倍高い発現が確認された。また、各トランスポーター群の遺伝子発現も上昇し、薬物代謝に関わる CYP2C9 は約 1.5 倍上昇が確認された。これ

らの結果より Cellbed®培養は生体内における薬剤耐性を再現できたことが示唆された。

これらの結果から、HepG2 細胞の Cellbed®培養は DOX に対する薬剤耐性現象を発現することが明らかとなり、この薬剤耐性現象が MDR1 阻害剤である Verapamil により阻害され、より低濃度の DOX で細胞増殖を抑制することが確認された。このことは、Cellbed®培養を用いたことで、生体内のがん組織と同じように三次元化に伴ったがん組織内部の HIF-1 α や MDR1 の働きを *in vitro* で模倣できている可能性が示唆された。さらに薬物代謝に関わる CYP やトランスポーター系の発現の上昇が確認されたため、Cellbed®を用いた培養系は、がん細胞に対する新規薬剤耐性克服薬のスクリーニング系として有用であることが示唆された。さらに、三次元培養としての spheroid 培養を増殖性のあるがん細胞に適用する場合、その粒径を均一にコントロールすることが難しく、Cell-based assay として利用する場合、測定結果のばらつきになりやすい。一方、細胞積層型の Cellbed®三次元培養では、細胞が球状集塊にはならず、バラバラの球状の積層三次元となるため、層の厚みをより均一に制御しやすい特徴が見られ、今後、Cell-based assay として発展する可能性があると思われる。

第 5 章 総論

現在、抗がん剤などの様々な医薬品が開発されているが、市販化に行き着く医薬品は、わずかしがなく、開発期間は 10 年あるいはそれ以上、研究開発費用は数百億円を超え、しかも年々膨大化してきている為¹⁰¹⁾、新しい医薬品の開発はリスクが非常に高いものとなっている。さらに開発途中で、前臨床から臨床試験に移行する際に脱落する候補医薬品の割合が多いのも問題となっている。前臨床での動物実験は、医薬品の体内動態、副作用の評価のためにはなくてはならないプロセスである。しかし、ヒトとその他の動物では存在する酵素のアイソザイム分子種及びその他の遺伝子に違いがあることが判明しつつある中で、医薬品開発の前臨床試験における化学物質等の安全性評価が、実験動物を用いる試験法を中心に標準化されていることが、多くの候補化合物の脱落の要因の一つとして挙げられている⁸⁴⁾。そのため、前臨床試験の前の段階で、できるだけ生体内の環境に近い形でヒトの細胞を用いた評価系を確立し、動物愛護の観点からも動物実験をできるだけ削減することが必要となっている⁸⁵⁾。

また、現在、一般的な細胞を用いた薬剤のスクリーニングでは、dish 上に単層培養を行う monolayer 培養が主流である。しかしながら monolayer 培養は、*in vitro* での観察や研究に便利な方法ではあるが、実際の生体内とは異なり、例えば抗がん剤において重要な、がん細胞の薬剤耐性能が生体内と比べ大きく劣っている。この差は、生体内の三次元構造とは異なった形態をとっている monolayer 培養では生体内の環境を反映できていないためと考えられる。そのため、抗がん剤のスクリーニングにおいて *in vitro* でいかに *in vivo* を正確に模倣できるかが重要である。

本論文では、成人肝細胞を日本バイリーン(株)製の三次元培養基材 Cellbed[®]で三次元培養し、三次元培養が遺伝子発現に与える影響を、三菱レイヨン(株)製と共同開発した肝臓細胞に関する遺伝子のプローブを搭載した DNA チップ Genopal[®] customized Hepatocyte chip を用いて検討した。また、HepG2 細胞においては本研究室で開発された spheroid 培養法も併せて用いて三次元培養し、細胞の薬剤耐性及び遺伝子の変化を検討した。

以下に各章で得られた知見を総括する。

第 2 章では、肝細胞に関する 188 の遺伝子の発現量を測定する Genopal[®] customized Hepatocyte chip を用いて、成人肝細胞の機能の長期維持が示唆された Cellbed[®]培養が与える各遺伝子発現への影響を評価した。その結果、まず二つの成人肝細胞の scatter plot から得られた正の相関関係により、Genopal[®] customized Hepatocyte chip の再現性の高さが確認された。また、培養終了後の SEM の観察により、全ての Cellbed[®]培養で細胞がファイバーに接着し、細胞層を形成するととも

に、肝機能の発現に有利とされる球状の形態を有している様子が観察され、Cellbed®培養による成人肝細胞の長期維持が確認された。次に、遺伝子発現においては、Cellbed®培養により、monolayer 培養に比べていくつかの遺伝子で特に高い発現上昇がみられ、傾向として CYP 群の遺伝子発現上昇が確認された。医薬品代謝の約 50%に関与していることから薬物代謝に最も重要であることが知られている CYP3 群の一つである CYP3A4 は、ヒト肝で発現する CYP の約 30%を占めている特に代表的な分子種であり、この CYP3A4 の発現は monolayer と比較して約 3.5 倍高い遺伝子発現が確認された。また、CYP2C19 や CYP2C9 もそれぞれ約 3.1 倍、約 3.2 倍と高い発現が確認された。また、薬物トランスポーターの一種である SLC トランスポーター群の SLC22A1 も約 2.9 倍の発現の上昇が確認された。これらの CYP 群や SLC トランスポーター群の遺伝子発現の結果から肝臓の薬剤代謝の機能を生体外で再現できたことが示唆された。さらに、肝機能とは無関係のがんに関連する遺伝子の発現の上昇は確認されなかったため、Cellbed®培養による肝機能関連遺伝子の発現上昇は、有意な結果であると思われる。

以上の結果より、Cellbed®培養は、成人肝細胞の生存率、薬物代謝活性、細胞障害の観点からの長期培養だけでなく、生体内の肝臓の機能再現にも有用であることが示唆された。一般的な、動物モデルを用いた前臨床試験はヒトでの安全性又は有効性を十分に評価することは困難であるため、このような肝臓の機能が再現されたヒトの細胞を用いたスクリーニングは特に重要であると考えられる。

第 3 章では、HepG2 細胞を本研究室の spheroid 培養法で三次元培養し、MDR1 の転写因子として知られている HIF-1 α の関与について、免疫染色による共焦点レーザー顕微鏡観察やウエスタンブロット解析により検討を行った。また、肝細胞に関する遺伝子の発現量を測定する Genopal® customized Hepatocyte chip を用いて、spheroid 培養が肝がん細胞に与える MDR1 等の遺伝子発現への影響を評価した。その結果、HIF-1 α の発現を免疫染色で確認したところ、monolayer 培養のコントロールに比べ spheroid 培養の方が HIF-1 α の発現が多く見られた。また、免疫染色の結果では低酸素状態になっていると思われる中心部以外でもその発現が見られた。この全体的な HIF-1 α の発現は、三次元を形成したことによる何らかの要因が考えられるため、今後検討が必要であると考えられる。さらにウエスタンブロットによる解析により spheroid 培養ではバンドが観察されたが、monolayer 培養では、バンドがほとんど観察されなかった。また、imageJ によりこのウエスタンブロットの画像を解析した結果、spheroid 培養の HepG2 細胞は、monolayer 培養と比べ、約 6.4 倍高く発現していることが示された。これらの結果より、spheroid 培養の HepG2 細胞は、monolayer 培養と比べ、HIF-1 α の増大が示唆された。また、HIF-1 α の発現が確認されたため、薬剤排出活性タンパク質である MDR1 の発現を免疫染色で解析

したところ、spheroid 培養は monolayer 培養に比べて顕著な増大が確認された。遺伝子発現解析においては、spheroid 培養で薬剤排出活性タンパク質である MDR1(ABCB1)の発現量が monolayer 培養と比較し、約 3.5 倍高い発現が確認され、また、9つの SLC トランスポーター群の遺伝子の上昇が確認された。

以上の結果より、spheroid 培養は生体内のがん組織にみられる HIF-1 α 及び薬剤排出活性タンパク質である MDR1 を *in vitro* で再現し、抗がん剤及び薬剤耐性克服薬のスクリーニングに有用であることが示唆された。

第 4 章では、HepG2 細胞を三次元培養基材 Cellbed[®]で三次元培養し、その薬剤排出活性について検討を行った。また、薬剤排出活性タンパク質である MDR1 を制御している HIF-1 α の発現を共焦点レーザー顕微鏡観察やウエスタンブロットにより解析した。さらに、MDR1 についても免疫染色による発現や、Genopal[®] customized Hepatocyte chip を用いて Cellbed[®]培養が HepG2 細胞に与える MDR1 遺伝子等への影響を検討した。その結果、Cellbed[®]培養した HepG2 細胞は、DOX に対する 50% 増殖抑制試験において、monolayer 培養と比較し、IC₅₀ 値が約 20 倍と有意に高い値を示した。この DOX に対する薬剤耐性は MDR1 を阻害する Verapamil により有意に阻害されたため、MDR1 の関与が示唆された。そこで MDR1 の転写因子である HIF-1 α の発現を検討したところ免疫染色では monolayer 培養に比べ Cellbed[®]培養の方が HIF-1 α の発現が多く見られた。さらにウエスタンブロットによる解析で、Cellbed[®]培養ではバンドが観察されたが、monolayer 培養ではバンドがほとんど観察されなかった。また、imageJ による画像解析の結果より、Cellbed[®]培養の HepG2 細胞は、monolayer 培養と比べ、約 1.5 倍の HIF-1 α タンパク質が発現していることが示された。これらの結果より、Cellbed[®]培養の HepG2 細胞は、monolayer 培養と比べ、HIF-1 α の増大が示唆された。HIF-1 α の発現が確認されたため、薬剤排出活性タンパク質である MDR1 の発現を同じく免疫染色で解析した所、Cellbed[®]培養は monolayer 培養に比べて顕著な増大が確認された。また、遺伝子発現解析においては、Cellbed[®]培養で薬物排出活性タンパク質である MDR1 の発現量が monolayer 培養と比べて約 1.6 倍高い発現が確認され、CYP 群や SLC トランスポーター群の遺伝子も上昇した。

以上の結果より、Cellbed[®]培養は HepG2 細胞で高い薬剤耐性を示し、生体内のがん組織にみられる HIF-1 α 及び薬剤排出活性タンパク質である MDR1 を *in vitro* で再現し、抗がん剤のスクリーニングに有用であることが示唆された。また、第 3 章の結果と比較すると spheroid 培養の方が HIF-1 α や MDR1 が高く発現しているように見えるが、両者は培養条件やサンプルの抽出方法が異なるため、単純な比較はここでは行っていない。特に HIF-1 α は通常酸素条件下で分解されるため、サンプルの抽出方法などは検討する必要があると考えられる。

本研究では、三次元培養における生体内の肝臓の機能再現及び肝がん細胞の薬剤耐性の発現についての知見が得られた。動物モデルの前臨床試験を行う上で、ヒトで意図する薬理作用が動物で発現されるとは限らないことや、ヒトでの毒性学的影響を適切に予測できない可能性があるなどの問題があるため¹⁰²⁾、ヒトの細胞を用いた *in vitro* 試験によりあらかじめリスク等を評価しておくことが望ましい。よって本研究から得られた、ヒトの細胞での肝臓の機能再現は薬剤の開発初期におけるスクリーニングにおいて、その毒性及び効能を予見するのに有用であると考えられる。また、肝がん細胞の高い薬剤耐性を *in vitro* で発現させた、spheroid 及び Cellbed[®] 培養も抗がん剤開発におけるスクリーニングに有用であると考えられる。また、三次元培養を Cell-based assay として確立することを考えた場合、増殖性のあるがん細胞の spheroid 培養では、その粒径を均一にコントロールすることが難しく、測定結果のばらつきになりやすい。一方、細胞積層型の Cellbed[®] 三次元培養では、細胞が球状集塊にはならず、平面の均一な積層三次元となるため、層の厚みをより均一に制御しやすい特徴が見られ、今後、Cell-based assay として発展する可能性があると思われる。

今後ヒト肝細胞の三次元培養によって、動物実験代替法への応用や新薬開発までの期間や費用の削減が可能になるものと期待される。また、各章を通じて使用した Genopal[®] customized Hepatocyte chip は、それぞれの結果で高い再現性を示し、同じ細胞で異なる培養法においてもその遺伝子発現の差異を測定できた。したがって Genopal[®] customized Hepatocyte chip は将来的に様々な培養法を用いたヒト肝細胞あるいは代替細胞の毒性、代謝、動態の評価系として有用であると考えられる。

今後、このような細胞培養技術や評価系のさらなる進歩によって、新薬の開発期間が短縮され、新薬が手元に届き多くの人を助けることを祈念してやまない。

参考文献

- 1) 厚生省薬務局新医薬品課長, 「抗悪性腫瘍薬の臨床評価方法に関するガイドライン」について (1991).
http://www.japal.org/wp-content/uploads/mt/19910204_9.pdf
- 2) 厚生労働省医薬食品局審査管理課長, 「抗悪性腫瘍薬の臨床評価方法に関するガイドライン」の改訂について (2005).
<https://www.pmda.go.jp/files/000206740.pdf>
- 3) 厚生労働省医薬食品局審査管理課長, 抗悪性腫瘍薬の非臨床評価に関するガイドライン (2010).
<https://www.pmda.go.jp/files/000208183.pdf>
- 4) W.M.S. Russell & R.L. Burch. *The Principles of Humane Experimental Technique.*, 238pp. London: Methuen. (1959).
- 5) T. Tsuruo, *Cancer Res.*, **79**, 285-296 (1988).
- 6) 中村祐輔, 稲澤譲治, 監修 「がんの診断と治療」, 東京大学出版, 188-190 (2006).
- 7) R. Gorlick, E. Goker, T. Trippett, *Cancer Res.*, **335**, 1041-1048 (1996).
- 8) R. J. Schilder, L. Hall, A. Monks, *Int. J. Cancer*, **45**, 416-422 (1990).
- 9) C. M. Galmarini, J. R. Mackey, C. Dumontet, *Leukemia*, **15**, 875-890 (2001).
- 10) S.L. Gerson, J.K. Willson, *Hematol. Oncol. Clin. North. Am.*, **9**, 431-450 (1995).
- 11) 谷口直之, 大島明, 鈴木敬一郎, 監訳 *がんのベーシックサイエンス* 第3版 MEDSI社 428-450 (2006).
- 12) K.D. Tew, *Cancer Res.*, **54**, 4313-4320 (1994).
- 13) J. Konig, A. T. Nies, Y. Cui, *Biochem. Biophys. Acta.*, **1461**, 377-394 (1999).
- 14) M. Gottesman, I. Pastan, *Annu. Rev. Biochem.*, **62**, 385-427 (1993).
- 15) H. Hamada, T. Tsuruo, *J. Biol. Chem.*, **263**, 1454-1458 (1988).
- 16) H. Hamada, T. Tsuruo, *Cancer Res.*, **48**, 4926-4932 (1988).
- 17) M. Naito, H. Hamada, T. Tsuruo, *J. Biol. Chem.*, **263**, 11887-11891 (1988).
- 18) A.R. Safa, C.J. Glover, J.L. Sewell, et al., *J. Biol. Chem.*, **262**, 7884-7888 (1987).
- 19) M. Naito, T. Tsuruo, *Cancer Res.*, **49**, 1452-1455 (1989).
- 20) M. Dean, Y. Hamon, and G. Chimini, *J. Lipid Res.*, **42**, 1007-1017 (2001).
- 21) T. Tsuruo, H. Iida, S. Tsukagoshi, et al. *Cancer Res.*, **41**, 1967-1972 (1981).
- 22) T. Tsuruo, H. Iida, S. Tsukagoshi, et al. *Cancer Res.*, **42**, 4730-4733 (1982).
- 23) A. Ramu, Z. Fuks, S. Gatt, et al. *Cancer Res.*, **44**, 144-148 (1984).
- 24) R. Ganapathi, D. Grabowski, *Cancer Res.*, **43**, 3696-3699 (1983).
- 25) T. Tsuruo, *Molecular and Cellular Biology of Multidrug Resistance in Tumor Cells*, Plenum Press, New York (1990).

- 26) T. Tsuruo, Circumvention of drug resistance with calcium channel blockers and monoclonal antibodies in Drug Resistance in Cancer Therapy, *Kluwer Academic Pub* (1989).
- 27) K. Yusa, T. Tsuruo, *Cancer Res*, **49**, 5002-5006 (1989).
- 28) M. Wartenberg, C. Frey, H. Diederhagen, J. Ritgen, J. Heascheler, H. Sauer, *Int. J. Cancer*, **75**, 855-863 (1998).
- 29) M. Wartenberg, F.C. Ling, M. Mushen, F. Klein, H. Acker, M. Gassmann, K. Petrat, V. Putz, J. Hescheler, H. Sauer, *FASEB J.*, **17**, 503-505 (2003).
- 30) K. Comerford, T.J. Wallace, J. Karhausen, N.A. Louis, M.C. Montalto, S.P. Colgan, *Cancer Res.*, **62**, 3387-3394 (2002).
- 31) M. Wartenberg, F.C. Ling, M. Schallenberg, A. T. Baumer, K. Petrat, J. Hescheler, H. Saucer, *J. Biol. Chem.*, **276**, 17420-17428 (2001).
- 32) K. Sakata, T.T. Kwok, B.J. Murphy, K.R. Laderoute, G.R. Gordon, R.M. Sutherland, *Br. J. Cancer.*, **64**, 809-814 (1991).
- 33) M. Dorthe, L. Le, D. Heinrich, K. Wagner, T. Hofer, *J. Biol. Chem.*, **277**, 9262-9267 (2002).
- 34) G.L. Semenza, G.L Wang, *Mol. Cell. Biol.*, **12**, 5447-5454 (1992).
- 35) G.L. Wang, G.L. Semenza, *J. Biol. Chem.*, **270**, 1230-1237 (1995).
- 36) G.L. Wang, B.H. Jiang, E.A. Rue, G.L. Semenza, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 5510-5514 (1995).
- 37) S. Hara, J. Hamada, C. Kobayashi, Y. Kondo, N. Imura, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **287**, 808-813 (2001).
- 38) H. Tian, S.L. McKnight, D.W. Russell, *Genes Dev.*, **11**, 72-82 (1997).
- 39) R.H. Wenger, *FASEB. J.*, **16**, 1151-1162 (2002).
- 40) G.L. Semenza, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **15**, 551-578 (1999).
- 41) M.S. Wiesener, H. Turley, W.E. Allen, C. Willam, K.U. Eckardt, K.L. Talks, S.M. Wood, K.C. Gatter, A.L. Harris, C.W. Pugh, P.J. Ratcliffe, P.H. Maxwell, *Blood*, **92**, 2260-2268 (1998).
- 42) Y. Makino, R. Cao, K. Svensson, G. Bertilsson, M. Asman, H. Tanaka, Y. Cao, A. Berkenstam, L. Poellinger, *Nature*, **414**, 550-554(2001).
- 43) Y. Makino, A. Kanopka, W.J. Wilson, H. Tanaka, L. Poellinger, *J. Biol. Chem.*, **277**, 32405-32408 (2002).
- 44) K. Gradin, J. McGuire, R.H. Wenger, I. Kvietikova, M.L. fhitelaw, R. Toftgard, L. Toru, M. Gassmann, L. Poellinger, *Cell Biol.*, **16**, 5221-5231 (1996).
- 45) P.J. Kallio, I. Pongratz, K. Gradin, J. McGuire, L. Poellinger, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 5667-5672 (1997).

- 46) H.C. Brahimi, N. Mazure, J. Pouyssegur, *Cell Signal.*, **17**, 1-9 (2005).
- 47) M.A. Déry, M.D. Michaud, D.E. Richard, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **37**, 535-540 (2005).
- 48) J.I. Bardos, M. Ashcroft, *Biochim. Biophys. Acta.*, **1755**, 107-120 (2005).
- 49) P.H. Maxwell, M.S. Wiesener, G.W. Chang, S.C. Clifford, E.C. Vaux, M.E. Cockman, C.C. Wykoff, C.W. Pugh, E.R. Maher, P.J. Ratcliffe, *Nature*, **20**, 271-275 (1999).
- 50) P. Jaakkola, D.R. Mole, Y.M. Tian, M.I. Wilson, J. Gielbert, S.J. Gaskell, A. von Kriegsheim, H.F. Hebestreit, M. Mukherji, C.J. Schofield, P.H. Maxwell, C.W. Pugh, P.J. Ratcliffe, *Science*, **292**, 468-472 (2001).
- 51) D. Lando, D.J. Peet, J.J. Gorman, D.A. Whelan, M.L. Whitelaw, R.K. Bruick, *Genes Dev.*, **16**, 1466-1471 (2002).
- 52) J.W. Jeong, M.K. Bae, N.Y. Ahn, S.H. Kim, T.K. Sohn, M.H. Bae, M.A. Yoo, E.J. Song, K.J. Lee, K.W. Kim, *Cell*, **111**, 709-720 (2002).
- 53) E. Lee, S. Yim, S.K. Lee, H. Park, *Mol. Cells*, **14**, 9-15 (2002).
- 54) A. Sodhi, S. Montaner, V. Patel, M. Zohar, C. Bais, E.A. Mesri, J.S. Gutkind, *Cancer Res.*, **60**, 4873-4880 (2000).
- 55) S.J. Kwon, J.J. Song, Y.J. Lee, *Clin. Cancer Res.*, **11**, 7607-7613 (2005).
- 56) K. Guillemin, M.A. Krasnow, *Cell*, **89**, 9-12 (1997).
- 57) A. Zagorska, J. Dulak, *Acta. Biochim. Pol.*, **51**, 563-585 (2004).
- 58) G.L. Semenza, *Physiology*, **19**, 176-182 (2004).
- 59) E.J. Yeo, Y.S. Chun, J.W. Park, *Biochem. Pharmacol.*, **68**, 1061-1069 (2004).
- 60) 山本貴金属地金株式会社 生体化学安全研究室 オーラルサイエンスレポート Vol.3 低酸素の世界 (2012).
- 61) J.D. Gordan, C.B. Thompson, M.C. Simon, *Cancer Cell*, **12**, 108-113 (2007).
- 62) S. Rey, G.L. Semenza, *Cardiovasc. Res.*, **86**, 236-242 (2010).
- 63) B. Keith, M.C. Simon, *Cell*, **129**, 465-472 (2007).
- 64) O. Warburg, *Science*, **123**, 309-314 (1956).
- 65) J.M. Brown, W.R. Wilson, *Nat. Rev. Cancer*, **4**, 437-447 (2004).
- 66) Y.I. Rattigan, B.B. Patel, E. Ackerstaff, G. Sukenick, J.A. Koutcher, J.W. Glod, D. Banerjee, *Exp. Cell Res.*, **318**, 326-335 (2012).
- 67) T. Fiaschi, A. Marini, E. Giannoni, M.L. Taddei, P. Gandellini, A.D. Donatis, M. Lanciotti, S. Serni, P. Cirri, P. Chiarugi, *Cancer Res.*, **72**, 5130-5140 (2012).
- 68) J. Jiang, Y.L. Tang, X.H. Liang, *Cancer Biol. Ther.*, **11**, 714-723 (2011).
- 69) Z. Ji, H. Long, Y. Hu, X. Qiu, X. Chen, Z. Li, D. Fan, B. Ma, Q. Fan, *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, **29**, 158 (2010).
- 70) L.B. Gardner, Q. Li, M.S. Park, W.M. Flanagan, G.L. Semenza, C.V. Dang, *J. Biol.*

- Chem.*, **276**, 7919-7926 (2001).
- 71) H. Harada, *J. Radiat. Res.*, **52**, 545-556 (2011).
 - 72) T. Matsushita, A. Kiyota, Y. Nishikura, M. Annno, R. Ueoka, *J. Oral Tissue Eng.*, **4**, 25-31 (2006).
 - 73) N. Koide, K. Sakaguchi, Y. Koide, K. Asano, M. Kawaguchi, H. Matsushima, T. Takenami, T. Shinji, M. Mori, T. Tsuji, *Exp. Cell Res.*, **186**, 227-235 (1990).
 - 74) T. Matsushita, H. Ijima, N. Koide, K. Funatsu, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **36**, 324-326 (1991).
 - 75) 松下琢, 井嶋博之, 船津和守, *人工臓器*, **21**, 1050-1054 (1992).
 - 76) H. Ijima, T. Matsushita, K. Nakazawa, Y. Fujii, K. Funatsu, *Tissue Eng.*, **4**, 213-226 (1998).
 - 77) E.S. Tzanakakis, C.C. Hsiao, T. Matsushita, R.P. Remmel, W.S. Hu, *Cell Transplant.*, **10**, 329-342 (2001).
 - 78) Y. Sakai, M. Suzuki, *化学工学論文集*, **17**, 667-670 (1991).
 - 79) H. Ijima, K. Nakazawa, H. Mizumoto, T. Matsushita, K. Funatsu, *J. Biomater. Sci. Polymer. Edn*, **9**, 765-778 (1998).
 - 80) A. Oshikata, T. Matsushita, R. Ueoka, *J. Biosci. Bioeng.*, **111**, 590-593 (2011).
 - 81) 田畑泰彦, 細胞の三次元組織化-その最先端技術と材料技術, **3**, 190-303 (2014).
 - 82) T. Iwasa, R. Watanabe, K. Sasaki, T. Matsushita, Y. Akihiro, M. Kawabe, *AATEX.*, **21**, 52-62 (2016).
 - 83) <https://www.mrc.co.jp/genome/>
 - 84) M.F. Paine, L.H. Hart, S.S. Ludington, et.al, *Drug Metab. Dispos.*, **34**, 880-886 (2006).
 - 85) T. Imai, *Drug Delivery System*, **22**, 48-53 (2007).
 - 86) J.C. Gerlach, *Int. J. Artif. Organs.*, **19**, 645-654 (1996).
 - 87) M. Uenishi, *MEMBRANE.*, **25**, 135-138 (2000).
 - 88) 大政 健史, 浦山 重雄, 山中 貢, 谷村 奈緒子, 片倉 啓雄, 岸本 通雅, 菅 健一, 絵野 澤伸, 雨宮 浩, *化学工学論文集*, **24**, 184-189 (1998).
 - 89) L. Prodanov, R. Jindal, S.S. Bale, M. Hegde, et al., *Biotechnol. Bioeng.*, **113**, 241-246 (2016).
 - 90) 石井貴晃, 崇城大学大学院工学研究科応用生命科学専攻博士論文 (2016).
 - 91) H. Hohjoh, T. Fukushima, *Gene.*, **391**, 39-44 (2007).
 - 92) JB. Morrill, *Scanning Electron Microscopy of Embryos. Academic Press, Inc.*, **27**, 263-293 (1986).
 - 93) 加藤 隆一, 鎌滝 哲也, 「薬物代謝学」, 東京化学同人, 9-24 (2002).
 - 94) 鎌滝 哲也, 高橋 和彦, 山崎 浩史, 「医療薬物代謝学」, 医学評論社, 7-9 (2010).
 - 95) 乾 賢一, 「薬物トランスポーター」, 羊土社, 12-68, (2009).

- 96) T. Tsuruo, M. Naito, A. Tomida, N. Fujita, T. Mashima, H. Sakamoto, N. Haga, *Cancer Sci.*, **94**, 15-21 (2003).
- 97) 高久史磨, 矢崎義雄監修, 「治療薬マニュアル」, 医学書院, 431 (2002).
- 98) M.M. Malinen, L.K. Kanninen, A. Corlu, H.M. Isoniemi, Y.R. Lou, M.L. Yliperttula, A.O. Urtti, *Biomaterials*, **35**, 5110-5121 (2014).
- 99) Q. Ke, M. Costa, *Mol. Pharmacol.*, **70**, 1469-1480 (2006).
- 100) S. Sakai, K. Inamoto, Y. Liu, S. Tanaka, S. Arii, M. Taya, *Cancer Sci.*, **103**, 549-554 (2012).
- 101) 八木 崇, 大久保 昌美, 医薬品開発の期間と費用, *JPMA News Letter*, 33-35 (2010).
- 102) 「医薬品開発におけるヒト初回投与試験の安全性を確保するためのガイダンス」について (2012).
<https://www.pmda.go.jp/files/000208199.pdf>

謝辞

本論文は、崇城大学大学院工学研究科応用生命科学専攻医用生体工学講座において、松下琢教授、古水雄志助教のご指導の下、博士後期課程3年間で行った研究をまとめたものである。

本研究を遂行するにあたり、終始御懇切な御指導ならびに御鞭撻を受け賜り、本論文を作成する上でも終始御指導下さいました松下琢教授に謹んで深く感謝を申し上げます。また、同研究室で適切な御指導ならびに多大な御助力を承りました古水雄志助教に謹んで感謝致します。

本研究を遂行するにあたり、終始御懇切な御指導ならびに御鞭撻を受け賜り、また、本論文を作成する上で貴重な御教示ならびに御助言を賜りました松本陽子教授に心より深く感謝致します。

本論文を作成するにあたり、友重竜一教授に貴重な御教示ならびに御助言を賜りました。ここに心より深く感謝致します。

本研究を遂行するにあたり、貴重な御教示ならびに御助言を頂きました後藤浩一教授に謹んで感謝致します。

本研究を遂行するにあたり、適切な御教示ならびに御助言を頂きました市原英明准教授に心より感謝致します。

本研究を遂行するにあたり、適切な御教示ならびに御助言を頂きました上岡龍一名誉教授に心より感謝致します。

本研究は、厚生労働省国立医薬品食品衛生研究所の石田誠一博士との共同研究です。Genopal[®] customized Hepatocyte chip に搭載する遺伝子の決定及び遺伝子解析の御助言を頂きました。ここに厚く御礼申し上げます。

本研究は、三菱レイヨン(株)との共同研究です。Genopal[®] customized Hepatocyte chip の作製および遺伝子の解析を行って頂きました。ここに厚く御礼申し上げます。

本研究は、日本バイリーン(株)との共同研究です。Cellbed[®]の作製および御提供、SEMによる観察、御助言を頂きました。ここに厚く御礼申し上げます。

講義またはセミナー等を通じて、本学応用生命科学専攻の諸先生方には多大な御教示ならびに御助言を頂きましたことを謹んで感謝を申し上げます。

優れた研究結果を残して行かれた先輩方をはじめ、実験面で協力いただいた押方歩氏、松尾拓哉氏、石井貴晃氏、坂木伸吾さん、飯干達郎君、才田義人君、千住修一朗君、馬場あゆみさん、三宅智恵さん、伊崎淳志君、市川雄大君、稲村恒亮君、大田裕也君、穴田春奈さん、山口茉未さん、白木明日香さん、長崎花佳さん、中村茉耶さん、古賀千晴さん、高尾彰一君、高宗寿光君、横山朋範君をはじめとする松下研究室、松本研究室の学生諸君に深く感謝致します。

最後になりますが、勉学の機会と多大なる経済的支援を与えてくれた両親、兄、祖父、祖母に心より感謝の意を表します。