

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K20171

研究課題名（和文）立体的薬物動態システムを利用したがん細胞の薬物耐性変化のモニタリング

研究課題名（英文）Monitoring changes in drug resistance in cancer cells using a three-dimensional pharmacokinetic system

研究代表者

宮本 大輔（Miyamoto, Daisuke）

長崎大学・医歯薬学総合研究科（医学系）・助教

研究者番号：10845481

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：ヒト肝細胞ならびに腸管上皮細胞を共培養させた薬物排泄システムを構築するとともに当システムによって代謝された抗癌剤ががん細胞スフェロイドに対する薬物応答性を評価実施した。大腸癌細胞株をスフェロイドプレートに播種・スフェロイド化し肝細胞ならびに腸管上皮細胞をセミコンフルまで培養したトランスウェルを介して抗癌剤を添加した。添加24時間後においては肝/腸細胞を介して代謝され添加5日目においては癌細胞スフェロイド外周に存在する細胞が崩壊している形態を示した。これらの結果より肝/腸トランスウェルを介することで生体内の薬物動態を再現することが可能となり、抗癌剤作用機序の違いを与えたことが考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年の細胞応答性評価研究では二次元的に複数の薬物動態関連細胞を配列させた技術が報告されているものの、生体内では物質拡散等の影響を考慮する必要がある。本研究ではトランスウェルの表面ならびに裏面に薬物動態関連細胞である肝細胞と腸管上皮細胞をそれぞれ播種することで立体的な薬物応答性システムを開発し、薬物動態関連細胞が代謝した抗癌剤によって癌細胞スフェロイドの応答性を評価することができた。これらの結果は生体内での抗癌剤応答を模倣するものであり、今後の薬物試験へ大きく貢献できると期待する。

研究成果の概要（英文）：We constructed a drug excretion system in which human hepatocytes and intestinal epithelial cells were co-cultured, and evaluated the drug response of anticancer drugs metabolized by the system against cancer cell spheroids.

Colon cancer cell lines were seeded and formed spheroid on cultured plates, and hepatocytes and intestinal epithelial cells were cultured to semi-confluence. After 24 hours of addition, the drug was metabolized through hepatocytes and intestinal epithelial cells, and on the fifth day of addition, the cells on the periphery of the cancer cell spheroid were disintegrated. These results suggest that the hepatic/intestinal transwell-mediated metabolism of the anticancer drug may reproduce the pharmacokinetics of the drug in vivo and may have different mechanisms of action of the anticancer drug.

研究分野：組織工学

キーワード：共培養 トランスウェル 癌細胞スフェロイド 薬物アッセイ

### 1. 研究開始当初の背景

生体内の薬物動態を評価するためには、複数の組織の作用を模倣させかつ立体的な物質拡散による薬剤暴露が必要である。さらに、生体内の物質分布に関しては体脂肪や血漿タンパク量などの物質に依存した物質分布の違いが生じ薬剤物質の供給は不規則に変化しやすいことが懸念されている。

現在、薬物動態試験においては機能発現が異なる複数の組織体を組み合わせることは *in vitro* における肝細胞の薬剤応答性を制御するうえで重要なアプローチである。細胞アッセイ研究において機能性が異なる複数の細胞群を利用する技術として「Body on a Chip」が注目されている。生体における薬剤応答は胃や小腸で行われる「吸収作用」、体脂肪や血漿アルブミン濃度に依存した「物質分布」、肝臓による「代謝作用」、腎臓や胆管による「排泄作用」といった様々な過程が存在している。Body on a Chip では数種類の薬物応答関連細胞をマイクロ流路基板上に配列させることで生体内の薬物動態の模倣を実現させている。しかし生体内の薬物動態は三次元的立体構造内を拡散しながら作用していくものの、Body on a Chip ではマイクロ流路という平面的な動きでの作用しか見えていないのが懸念材料である。そこで Body on a Chip 技術の概念を持ちつつ、三次元組織特有の物質拡散を考慮した薬剤アッセイモデルの構築が重要である。

そこで本研究では物質拡散性を制御する多孔質インサート膜上に複数の薬物動態関連細胞を重層化させることで生体内の薬物動態を模倣させた立体的アッセイモデルの構築を試みるという発想に至った。

### 2. 研究の目的

本研究では物質拡散性を制御する多孔質インサート膜上に薬物動態関連細胞である腸管上皮細胞、肝細胞、胆管上皮細胞を重層化させた組織体を形成し生体内での薬物動態を模倣させた立体的薬物動態システム(図1)の確立ならびに癌細胞アッセイへの応用を試みるために以下の内容に取り組んだ。

- ・腸/肝/胆管重層化組織の最適化
- ・立体的薬剤代謝システム」の確立
- ・「立体的薬剤代謝システム」を介した癌細胞スフェロイドに対するアッセイ評価

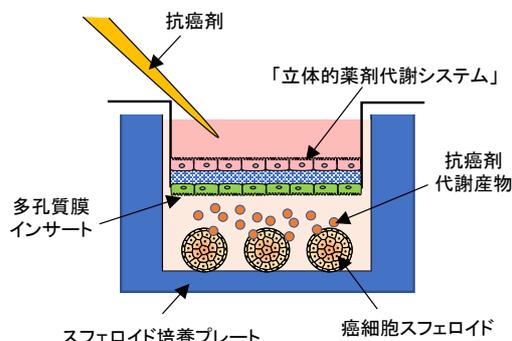


図1.新規癌細胞スフェロイドアッセイシステムの概略

### 3. 研究の方法

スフェロイド培養プレートにヒト子宮頸がん細胞株 (HeLa 細胞) ならびに大腸がん細胞株 (HT29 細胞) をスフェロイドあたり 200 個の細胞密度にて三次元培養を実施し様々な抗癌剤 (メルカプトプリン、ドキシソルビシン、カフェイン等) を添加させ画像解析ソフトを利用してスフェロイドサイズ形態にて評価を行った。次にコラーゲン修飾器財 (コラーゲンコートトランスウェルあるいはコラーゲンコートディッシュ) にラット初代腸管上皮細胞株 (IEC-6) ならびに凍結ヒト初代肝細胞 (CyHh) に播種し性能評価を実施した。

### 4. 研究成果

#### (1) 癌細胞スフェロイドにおける薬剤応答性の評価

まずスフェロイド培養プレートに 200cells/well の密度にて HeLa 細胞を播種し 3 日間培養を行った。培養 3 日目のスフェロイドはおおよそ 140 $\mu$ m に到達していた。このスフェロイドに抗癌剤の一種であるメルカプトプリンを添加させた結果、処理 1 日目には未添加条件に比べスフェロイド縁側部において組織が崩壊している形態を示した (図 2-A)。さらに画像解析にてスフェロイドサイズを確認したところ、メルカプトプリン添加に伴いスフェロイドサイズが減少していた (図 2-B)。

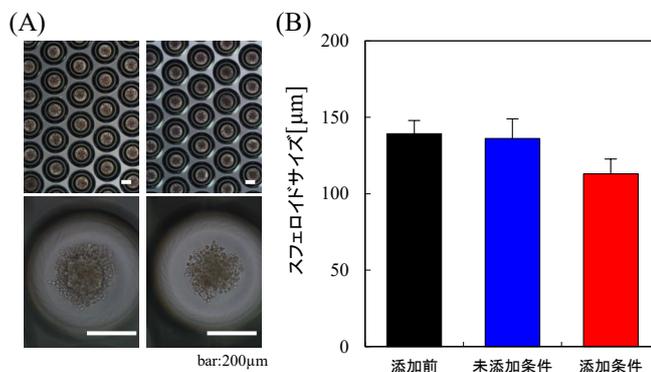


図2. HeLa 細胞スフェロイドへの抗癌剤添加に伴うサイズ変化。

これらの結果より、抗癌剤添加に伴う細胞応答は培養初期より顕著に表れ、画像解析によるサイズ定量は有効な手法の一つであることが示唆された。

## (2) 代謝細胞を介した抗がん剤に対する HeLa 細胞スフェロイド応答

CyHH を播種し 2 日間培養したコラーゲン膜トランスウェル (Hep-Trans) を作製した。並行してスフェロイド培養プレートにて HeLa 細胞スフェロイドを形成し 3 日間培養を行った。各々にて培養した CyHH ならびに HeLa 細胞を組み合わせ、CyHH を介して抗がん剤を添加した。添加 1 日目においては CyHH を介していない条件において一部スフェロイドの崩壊現象が確認された。しかし添加 3 日目および添加 8 日目においてはどちらの条件においてもほとんどのウェル内でスフェロイドの崩壊現象を確認した。

これらの結果より、肝細胞を介することで癌細胞スフェロイドに対する初期の応答性に違いを生じさせることが可能である事が示唆された。

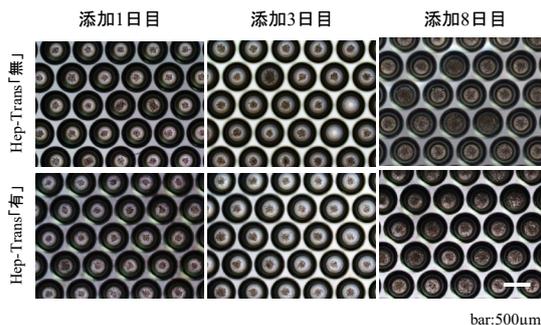


図 3. 代謝細胞を介した HeLa 細胞の抗がん剤応答。

## (3) 肝/腸複合型トランスウェルを介した抗がん剤に対する HeLa 細胞スフェロイド応答

コラーゲン膜トランスウェルでの両面共培養を実施するため、まずコラーゲン膜トランスウェルの裏面に CyHH を播種し培養 5 時間後にトランスウェルを反転させ、2 日間培養を行った。その後トランスウェルの表面に IEC-6 を播種・1 日間培養を行ったトランスウェル (HIT) を作製した。並行して HT29 細胞スフェロイドを 3 日間培養後、HIT と組み合わせ抗癌剤 (ドキソルビシン: DOX) に対する応答を評価した。添加 1 日目には DOX が有する赤色の色素が HIT(-) 群では HT29 スフェロイドの表面に着色しているものの、HIT(+) 群ではスフェロイド表面に色素が着色することなく癌細胞スフェロイドに作用した。添加 5 日目においては HIT(-) 群では癌細胞スフェロイドが崩壊したものの、HIT(+) 群ではスフェロイド縁側部で崩壊しているものの組織形状を維持するものも確認できた。この現象は腸/肝細胞を介することで DOX が代謝され代謝産物化した抗癌剤が癌細胞スフェロイドに作用しており、HIT を介した薬剤応答は生体内の薬物動態を模倣できたのではないかと考えられる。

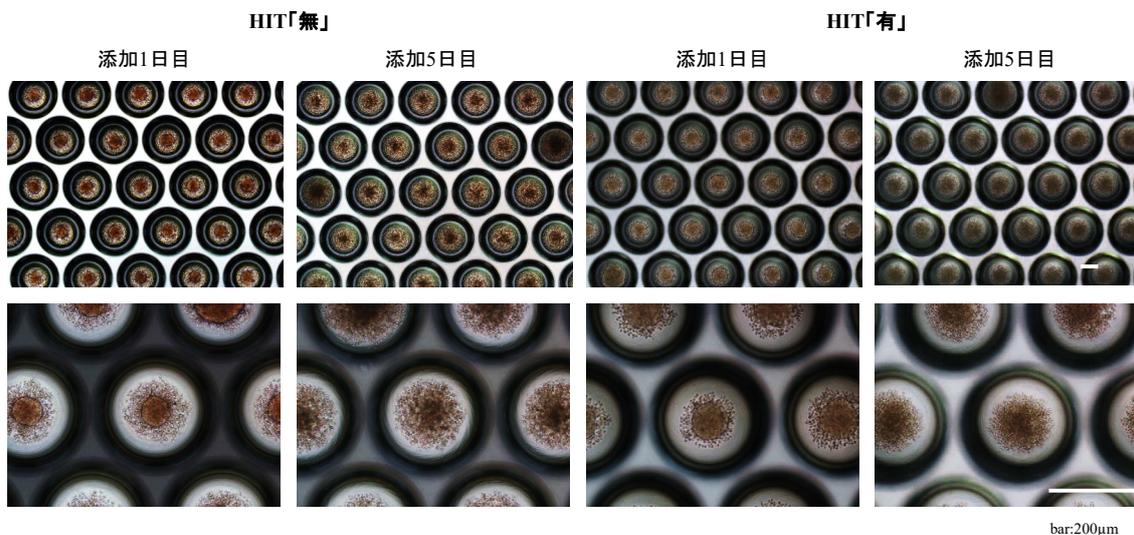


図 4. HIT を介したドキソルビシン添加による癌細胞スフェロイドの薬剤応答。

## (4) ヒト iPS 細胞由来肝芽細胞を利用した胆管ネットワーク形成

抗癌剤の薬剤応答システムに使用する代謝細胞においては初代ヒト細胞の利用が必要不可欠である。そこでヒト iPS 細胞由来肝芽細胞を用いて排泄機能を有する胆管上皮ネットワーク構造を試みた。まずコラーゲンコーティング器材上にヒト臍帯静脈血内皮細胞ならびにヒト真皮由来線維芽細胞を播種しフィーダー層を構築した。コンフレント状態であることを確認したのちに、ヒト iPS 細胞由来肝芽細胞を播種した。その後胆管誘導においてはラット細胞の先行研究 (Y. Huang, D. Miyamoto et al, 2021) にて確立した誘導プロトコルに複数の成長因子を添加して培養を行った。

iPS 細胞由来肝芽細胞は培養 3 日目においてフィーダー層にてコロニーのような凝集体を構築し細胞増殖した。培養 7 日目にはネットワーク様構造を形成した (図 5-A)。この時の胆管ネットワークシステムの遺伝子発現を解析した結果、胆管系トランスポーター (CFTR ならびに NTCP) が分化誘導前に比べ高い発現を示した。さらに、血管系マーカー (vWF) や成長因子分泌 (PDGFb) に関しても優位に発現していた (図 5-B)。

これらの結果より、ヒト由来細胞から薬剤代謝を促すアッセイシステムを構築させることが

可能である事が示唆され、薬物動態試験へ応用が期待できる。

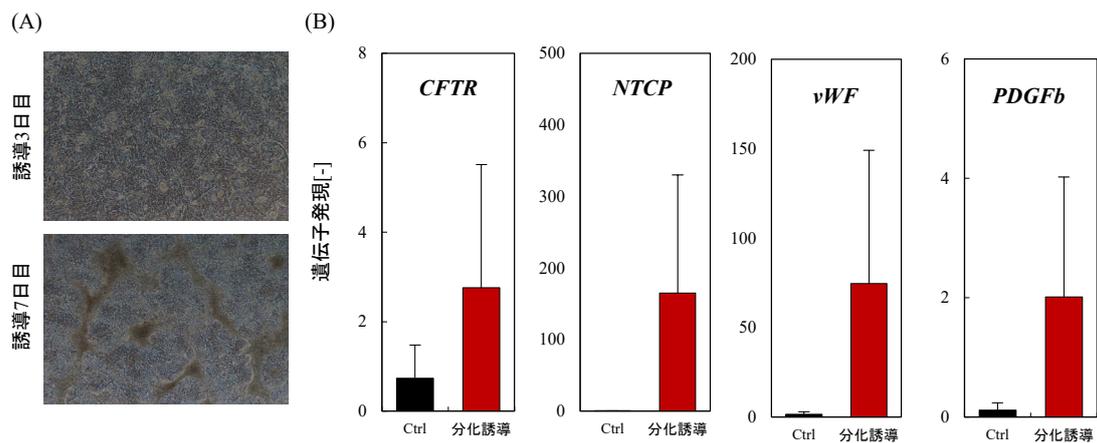


図 5. ヒト iPS 細胞由来肝芽細胞を利用した胆管ネットワーク形成。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------