

令和 5 年 5 月 12 日現在

機関番号：11401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K19979

研究課題名（和文）生体を模倣したin vitro毒性評価を実現する魚類肝細胞スフェロイドの高機能化

研究課題名（英文）Development of culture method of fish hepatocyte spheroids for in vitro environmental assessment

研究代表者

本田 晴香（古賀晴香）（Honda, Haruka）

秋田大学・理工学研究科・助教

研究者番号：90756983

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：魚類肝細胞は、in vitroにおける環境評価試験や環境毒性試験での重要な細胞源である。魚類肝細胞を用いたセルベースアッセイでは、細胞をシャーレ底面に接着、伸展させる単層培養法が利用されてきた。一方、細胞を三次元的に集合・凝集させるスフェロイド培養は、単層培養よりも生体に近い機能を模倣できることが数多く報告されている。

申請者は、スフェロイド形成時に細胞外マトリクス（ECM）を添加することで、魚類肝細胞スフェロイドのさらなる機能発現の向上を発想した。本研究では、スフェロイド化とECM成分添加の相乗効果により、細胞の立体構造や機能を長期維持可能な、魚類肝細胞スフェロイド培養方法の確立を目指す。

研究成果の学術的意義や社会的意義

年々、使用される化学物質の種類は増加し、複雑な混合物となった環境水が、環境へ悪影響を及ぼすことが懸念されている。排水評価試験の一つに全排水毒性（WET）試験があるが、個体の飼育や維持など煩雑な操作を伴う。WET試験の対象として、簡便に培養や試験が可能な培養細胞の利用が考えられるが、生体の応答性や機能を完全に反映することはできない。本研究の成果によって、長期培養が可能な「in vitro魚類肝臓モデル」を作製することができれば、単層培養では不可能であった慢性毒性や生体蓄積の評価を、in vitroで行うことが可能になる。

研究成果の概要（英文）：Fish-derived primary cells or cell lines are essential cell sources for environmental assessment and ecotoxicity studies in vitro. In cell-based assays using fish hepatocytes, a monolayer culture method has been used in which cells adhere to the cell culture surface.

In vitro model is the 3D spheroid culture that is well established in mammalian cells because it has been suggested to better reflect in vivo response than monolayer cultures. However, there are few reports about the spheroid culture of fish-derived cells compare with mammalian cells.

The extracellular matrix is an important regulator of cell function. Cells in spheroids interact with intercellular and extracellular matrices. Therefore, this study aims to establish a culture method to improve the function of fish hepatocyte spheroids by adding an extracellular matrix (ECM) during spheroid formation.

研究分野：バイオマテリアル

キーワード：魚類肝細胞 スフェロイド 細胞外マトリクス

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

魚類培養細胞は、排水や化学物質の有毒性を評価する毒性試験で多用されている。培養細胞の利用は、魚類の個体(生体)そのものを扱う試験よりも操作を単純化でき、多量のサンプル処理が可能である。特に、様々な薬物の代謝機能を担う肝細胞は、水質評価や毒性試験の主なターゲットである。

魚類肝細胞の培養は、シャーレ底面に細胞を接着・伸展させる「単層培養法」が用いられる。しかし本法では細胞が過度に伸展し、細胞が元来有する立体構造や機能を模倣できない。また、近年の水質汚染は低濃度の化学物質が長期間生体に作用する点が問題となっているが、単層培養は数週間以上の培養が困難であり、慢性毒性や生体蓄積の評価が不可能であった。そこで申請者は、生体内の細胞の立体構造や機能を模倣し、それを少なくとも1ヶ月間維持できる魚類肝細胞の培養方法を確立することが必要であると考えた。

肝細胞の機能維持が可能な培養方法として、「スフェロイド培養」がある。哺乳類の肝細胞は、細胞を三次元的に集合させたスフェロイド培養によって、生体に近い構造や機能を模倣できる。スフェロイド化によって細胞を密に集合させれば、隣接する細胞間の相互作用を増強することが可能である。

2. 研究の目的

生体内の細胞は、細胞間だけでなく細胞外マトリクス(ECM)とも密に相互作用し、その機能を発揮している。スフェロイド培養は有用である一方、自発的にスフェロイドを形成させる方法(例:細胞非接着性基板を用いたスフェロイド形成手法)におけるECMとの相互作用は、細胞自身が分泌するECMのみに依存している。そこで、スフェロイド形成時にECM成分を添加することで、細胞-ECM間の相互作用を増強できると考えた。本研究では、スフェロイド化+ECM成分添加の相乗効果により、生体内の細胞の立体構造や機能を模倣し、それを少なくとも1ヶ月間維持できる魚類肝細胞の培養方法の確立を目指す。

3. 研究の方法

申請者はこれまでに、哺乳類培養細胞のスフェロイド形成基板の開発を行ってきた。この基板表面は細胞非接着性であるため、細胞同士の凝集を促進する。さらに、この基板表面には数百 μm の微細孔が規則的に並んでおり、均一なサイズのスフェロイドを大量に形成できる(図1)。そのため、セルベースアッセイに適した手法であると考えている。しかしこの手法は、細胞の自発的な集合によってスフェロイドを形成するため、細胞とECMとの相互作用は、細胞自身が分泌するECMのみに依存している。

本研究では、環境分野で汎用的な魚類肝ガン由来細胞株のPLHC-1細胞(ATCCより購入)を用いて実験を行った。まずは、微細構造を有するアガロースゲル培養基板を作製し、PLHC-1細胞スフェロイドを作製した。スフェロイドの形状、CDFDA染色、およびEROD活性測定により、スフェロイドの特徴を評価した。続いて、高機能発現・機能維持が可能なECM成分の種類と濃度を決定し、スフェロイド培養とECM添加の相乗効果の有用性を検証した。

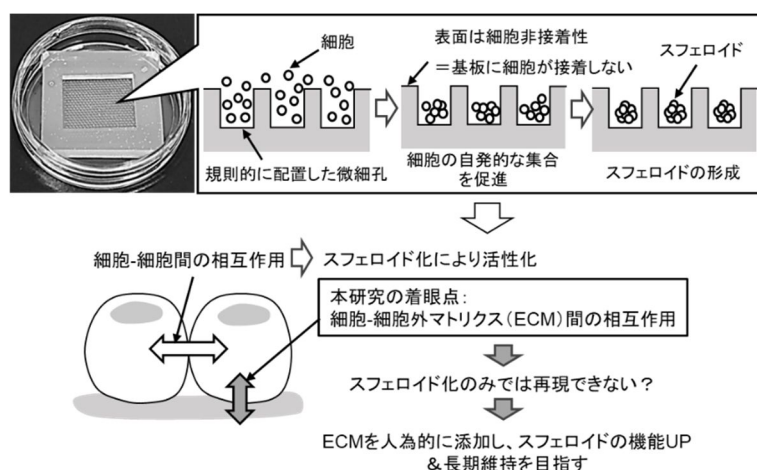


図1. アガロースゲルを用いたスフェロイド形成手法と本研究の着眼点

4. 研究成果

肝機能の指標となる薬物代謝酵素マーカーの決定

薬物代謝を担うシトクロム P450 (CYP) は、肝細胞分化のマーカーの一つである。しかし、魚類由来細胞の CYP 発現に関する知見は少ない。そこで、PLHC-1 細胞に様々なモデル化合物を曝露した際に、どの CYP 分子種の発現が誘導されるか、すなわち、PLHC-1 細胞の機能の指標となる CYP 分子種を選定した。様々なモデル化合物を曝露したところ、PLHC-1 細胞は CYP1A1

の酵素活性を高く維持していた。しかし、CYP2B1/2/4、および CYP3A4 の発現は誘導されなかった。そこで、CYP1A1 の酵素活性を肝機能のマーカーとして使用した。

PLHC-1 細胞スフェロイドの形成と評価

PLHC-1 細胞は、アガロースゲル上で、均一なサイズのスフェロイドを形成した。スフェロイドを形成すると、単層培養よりも増殖が抑制される傾向があった。中心部の酸素・栄養素の枯渇や、細胞同士の接触阻害などが影響していると考えられる。また、PLHC-1 スフェロイドは、3~4 日かけて凝集し、4 日目以降、徐々にサイズが大きくなった。細胞播種密度 500cells/microwell の条件で、スフェロイド内部が良好に生存していた。そこで以降のアッセイでは 500 cells/microwell の条件で播種した。さらに、スフェロイドに CDFDA (毛細管様構造に特異的に排泄、蓄積する物質) を曝露したところ、CDFDA の排泄が観察された(図 2(A))。また、CYP1A1 の酵素活性を評価したところ、単層培養よりも高い活性を示した(図 2(B))(データは 14 日目までを記載)。

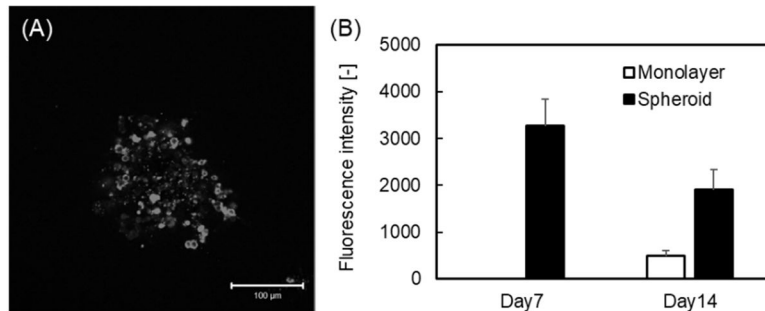


図 2. PLHC-1 細胞スフェロイドの特性評価。PLHC-1 細胞スフェロイドの CDFDA 染色 (A)、および CYP1A1 の酵素活性 (EROD 活性測定法による測定) (B)。

PLHC-1 細胞スフェロイドの PAHs に対する応答

多環芳香族炭化水素 (PAHs) は、有機化合物でありながら、大気中、土壤中、および水環境中에서도検出される。PAHs は、急性毒性は示さないものの、肝臓に蓄積する性質があることが知られている。PLHC-1 細胞スフェロイドに PAHs を曝露し、その形態変化を観察した。単層培養の PLHC-1 細胞にベンゾ[a]ピレン (B[a]P) 曝露した群では、数日で細胞数が減少した。一方、PLHC-1 細胞スフェロイドに B[a]P を曝露した群では、スフェロイドの形状は徐々に変化した。スフェロイドに B[a]P を 24 時間暴露後、蛍光顕微鏡で観察したところ、スフェロイド表面に B[a]P 特有の蛍光が見られた。すなわち、スフェロイド表面に吸着、または内部に蓄積した B[a]P が、長期間に渡って細胞に影響を与え、毒性を示したものと考えられる。スフェロイドを用いることで、慢性毒性や化合物の蓄積を評価できる可能性を示した。

ECM 添加による PLHC-1 細胞スフェロイドの形成と機能への影響

本研究では、ブタ皮膚由来コラーゲン溶液、人工コラーゲンペプチド溶液、およびブタ皮膚由来ゼラチン溶液の 3 種類の ECM を使用した。分散した細胞に ECM 溶液を添加し、細胞を ECM に浸したのち、スフェロイド形成基板に播種した。ゼラチン添加群がやや高い CYP1A1 の酵素活性を示したものの、顕著な機能活性の向上は見られず、スフェロイドの形成過程にも影響しなかった。

また、市販のゼラチンパウダー (Genocel) を用いてスフェロイド形成を試みた。パウダー状の ECM は微細加工をした基材には向かないため、U 字型プレートでスフェロイドの形成を試みた。播種密度が低い場合は、ゼラチンと細胞とのまとまりが悪く、培養 5 日経過してもスフェロイドを形成できなかった(図 3(A))。一方、播種密度が高い場合、ドーナツ状のスフェロイドが形成された。スフェロイドのサイズが大きくなると、内部に壊死層が発生することが明らかとなっている。ゼラチンパウダーによってスフェロイド内部に空隙を形成させることで、サイズの大きなスフェロイドの形成には、ゼラチンパウダーが有効である可能性が示唆された(図 3(B))。

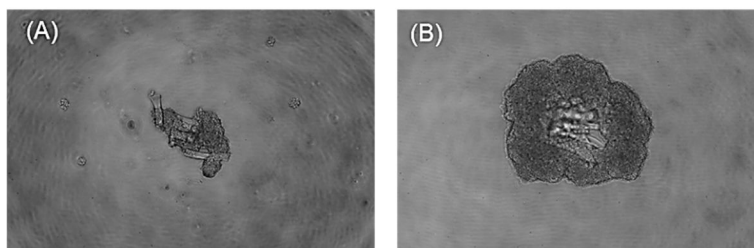


図 3. ゼラチンパウダー添加による PLHC-1 細胞スフェロイドの形成 (培養 5 日目)。低密度で播種した場合 (A) および高密度で播種した場合 (B)。

ECM 以外の因子の検討

本研究を進める中で、高酸素透過性材料を使った培養基板を試す機会を得た。この基板はシャーレの底面に高酸素透過性材料が用いられており、気液界面だけでなく、シャーレ底面からの酸素供給が可能である。単層培養ではあるが、PLHC-1 細胞をこの基材上で培養し、CYP1A1 の酵素活性を EROD 活性測定法によって測定したところ、ポリスチレンシャーレよりも高い酵素活性を示す可能性を得た。実際に、環境水中の低酸素化は、魚類の様々な器官の代謝活性の低下を招くことが知られている。in vitro においても、培養系への酸素供給を向上させれば、魚類肝細胞の代謝活性の上昇につながる可能性が考えられる。

本研究の成果のまとめ

今回の実験条件では、ECM 添加の相乗効果を引き出すことができなかった。スフェロイド形成基材の形状と ECM の種類（由来となる動物種や分子量等）の組合せが大きく影響しているものと考えている。一方で、パウダー状の ECM と U 字型プレートでの組合せ、または、高酸素透過性材料を使った培養基板が、PLHC-1 細胞の高機能化に有効である可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 本田晴香, 上田珠莉
2. 発表標題 魚類由来肝細胞株のスフェロイド形成と生物応答性試験への応用
3. 学会等名 日本動物実験代替法学会第34回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 R. Fujii, N. Miyamoto, K. Yoshida, Y. Tanaka, H. Honda
2. 発表標題 Formation of fish hepatocyte spheroids using agarose gel concave microwells chip for biomonitoring
3. 学会等名 IUMRS-ICYRAM 202 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 本田晴香
2. 発表標題 培養細胞の三次元化とバイオアッセイツールへの応用
3. 学会等名 秋田応用生命科学研究会 第35回講演会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

スフェロイド形成基材について、企業との技術交流を行った（1件）。

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
---------	---------