

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 6日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22710062

研究課題名（和文） In vitro 毒性試験に必要な十分な再構築型細胞組織の極小化限界を探る

研究課題名（英文） Examination of the Minimum Required Size of Cell Aggregates for in Vitro Toxicity Tests

研究代表者

小森 喜久夫 (KOMORI KIKUO)

東京大学・生産技術研究所・助教

研究者番号：60431813

研究成果の概要（和文）：

本研究では、三次元細胞凝集体の大きさを制御し、生体内での主要な毒性発現メカニズムと同質の応答を示す凝集体の最小サイズを明らかにすることを目的とした。マイクロウェル構造を配備したポリジメチルシロキサン（PDMS）テンプレートを作製し、マイクロウェル内でヒト肝ガン細胞株 Hep G2 の凝集体を形成させた。マイクロウェルの大きさを調節することにより、細胞凝集体の大きさを制御した。薬物代謝酵素シトクロム P450 1A1/2 (CYP 1A1/2) の活性を調べたところ、直径 200  $\mu\text{m}$ ・高さ約 60  $\mu\text{m}$  以上の大きさの凝集体の活性は、直径 63  $\mu\text{m}$ ・高さ約 70  $\mu\text{m}$  の凝集体のものよりも 3-5 倍高くなった。また、CYP 1A1/2 に代謝されてより強い毒性を示すアフラトキシン B1 (AFB1) を凝集体に暴露したところ、直径 200  $\mu\text{m}$  以上の凝集体の用量作用曲線は、直径 63  $\mu\text{m}$  のものよりも 1 桁低濃度側にシフトした。また、ラット成熟初代肝細胞でも同様の検討を行ったところ、直径 110  $\mu\text{m}$  の球状の凝集体の AFB1 に対する用量作用曲線は、直径 35  $\mu\text{m}$  の球状のものよりも 1 桁低濃度側にシフトした。一方、酸素感受性の発光色素白金オクタエチルポルフィリン (PtOEP) をマイクロウェルの底面にコートした、凝集体の呼吸活性を非侵襲的に評価可能なガラス製プレートの開発も試みた。マイクロウェル内で肝ガン細胞株 Hep G2 の三次元細胞組織を培養したところ、PtOEP の発光強度から、細胞組織の呼吸活性を評価できた。これらのことから、本方法論を用いることにより、生理学的に同質の応答を示す各種臓器由来の細胞凝集体の大きさを決定できるものと期待される。

研究成果の概要（英文）：

In the present work, a three-dimensional micro-tissue of human hepatocarcinoma Hep G2 cells was formed in microwells incorporated in a polydimethylsiloxane sheet and was determined its minimum required size for in vitro toxicity analyses. Based on the EROD assay, the intracellular enzyme cytochrome P450 (CYP) 1A1/2 activity was evaluated as an index of liver functions. The drug metabolic activity for the micro-tissue 200  $\mu\text{m}$  or larger in diameter was 3-5 times higher than that 63  $\mu\text{m}$  in diameter, indicating a threshold level of the activity appeared between 63 and 200  $\mu\text{m}$  in diameter. EC50 values to aflatoxin B1 for micro-tissues 200  $\mu\text{m}$  in diameter or larger is one order of magnitude lower than that 63  $\mu\text{m}$  in diameter and were nearly equal to that for a conventional 96-well plate (6.4 mm in diameter). On the other hand, a well-of-the-well system based culture plate with an oxygen sensing photoluminescence probe was also developed for the determination of a cellular respiratory activity. Thus, the present methodology allows for the determination of the minimum required size of the three-dimensional micro-tissue consisting of organ-derived cells for in vitro toxicity analyses.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学 放射線・環境物質影響科学

キーワード：トキシコロジー

1. 研究開始当初の背景

医薬品等の効果や毒性を評価する手法として、培養細胞を利用した *in vitro* 評価系の開発に注目が集まっている。特に、培養細胞を狭い領域にアレイ化したセルチップはハイスループットな評価系として簡便に利用でき、試験の効率化によるコスト低減や動物実験代替による倫理的問題の回避という観点で有用性が高い。培養細胞のアレイ化では、より少ない細胞数をより小さい領域にスポットし、妥当性のある生理学的応答を取得できることが理想的である。しかし、現在広く行われている試験は必要過剰量の培養細胞を用いているのが実状であり、細胞集団の極小化限界に関する検討はなされていない。また、本来なら生理学的に妥当な組織・臓器の応答の評価可能性が最重要であるはずだが、近年報告されているチップの多くのは工学的デザインの新規性に重点が置かれてしまっている。

2. 研究の目的

本研究では、評価可能な細胞の応答の妥当性に着目し、平面上に形成したマイクロウェル構造を利用して、三次元細胞組織の大きさを数十個細胞レベルから数千～万個レベルまで広範な領域で変え、有害性物質の毒性発現メカニズムと応答とを再現するのに必要十分な細胞組織の極小化限界（閾値）を明確にすることを目的とした。また、細胞の毒性試験に利用可能な、非侵襲評価系の開発を試みた。

3. 研究の方法

(1) マイクロウェル構造の高酸素透過性 PDMS テンプレートの作製

マイクロウェル構造が存在する PDMS テンプレートを、リソグラフィ法を利用して2種類作製した。1つ目は、同一平面上に直径約 63、200、630、2000 μm、深さ約 30 μm のものを (図 1A)、もう2つ目は、ハニカム

型のマイクロウェル構造のもの (図 1B) とした。具体的な作製法は、ネガティブフォトリソグレイドである SU-8 を Si ウエハ上に塗布し、露光・現像することにより鋳型 (凸型) を作製し、この鋳型表面に PDMS と硬化剤をコートした後、加熱成型にした。得られたテンプレートの表面全体またはマイクロウェル内以外の表面を、細胞・タンパク非付着性材料の 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) ポリマーを被覆したり、マイクロウェル内だけにコラーゲンを被覆したりして、表面を処理した。

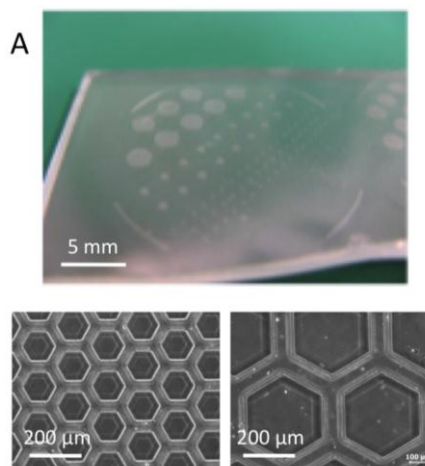


図1 (A) 同一平面上に大きさの異なるマイクロウェルを配列させた PDMS テンプレートと (B) マイクロウェルをハニカム状に配列させた PDMS テンプレートの写真

(2) 細胞凝集体の形成

ヒト肝ガン細胞株 Hep G2 やラット初代成熟肝細胞を作製したテンプレート表面に播種し、インキュベータ (37 °C、5% CO<sub>2</sub>) 内で培養して細胞凝集体を形成させた。なお、ラット初代成熟肝細胞の採取には、大学内に設置されている動物実験委員会の承認を受

け、定められた動物実験指針に沿って行った。凝集体の観察には、位相差顕微鏡や共焦点レーザー顕微鏡を使用した。

### (3) 細胞凝集体の機能評価と毒性評価

得られた細胞凝集体の機能評価として、肝薬物代謝の指標となる酵素活性を EROD アッセイで評価した。有害物質の細胞凝集体への毒性は、細胞生存率を指標として評価した。

### (4) 発光色素を導入したマイクロウェルプレートの作製

白金 octaethylporphyrin (PtOEP) を含むポリスチレン膜をガラス板表面に被覆した後、直径 750  $\mu\text{m}$  の穴の開いたガラス板を貼り合わせた。マイクロウェル内に Hep G2 凝集体を 1 つ入れ、インキュベータ内で培養した。マイクロウェル底面の PtOEP の発光を蛍光顕微鏡で観察するとともに、画像解析ソフト Image J を利用して発光強度を評価した。

## 4. 研究成果

### (1) 肝ガン細胞株 Hep G2 細胞組織の大きさとチトクロム P450 1A1/2 活性の関係性の解明

図 1A の PDMS テンプレートに Hep G2 を初期密度  $2.0 \times 10^5 \text{ cell cm}^{-2}$  で播種したところ、細胞はマイクロウェル内で接着し、マイクロウェル以外の表面ではほとんど接着しなかった。このプレートをさらに培養したところ、細胞はマイクロウェル内で増殖し、細胞組織を形成した。図 2 に培養 4 日目の細胞形態を、また図 3 に培養日数に対する細胞組織の高さ変化を示した。その結果、すべてのマイクロウェル中の細胞組織の高さは、培養日数の増加とともに大きくなり、培養 3 日目以降からはほぼ一定になった。細胞組織の高さが大きくなった理由として、本研究で用いている細胞がガン化細胞だからである。また、マイクロウェルの直径が小さくなるほど、細胞組織の高さは大きくなった。これは、細胞組織の成長や発達に酸素が関与しているからである。直径の小さい細胞組織では、酸素は三次元的な球面拡散により供給される。一方、直径が大きい細胞組織では、酸素は二次元的な平面拡散により供給される。したがって、マイクロウェルの直径が小さいほど比較的三次元的な細胞組織の構造を形成し、マイクロウェルの直径が大きくなるほど、二次元的な構造のものを形成することが考えられる。

次に、培養 5 日目での、マイクロウェルの単位面積当たりの細胞内代謝酵素チトクロム P450 (CYP) 1A1/2 活性を、蛍光標識法を用いて調べた。ここでは、3-methylcholanthrene (3MC) で CYP 1A1/2 活性を

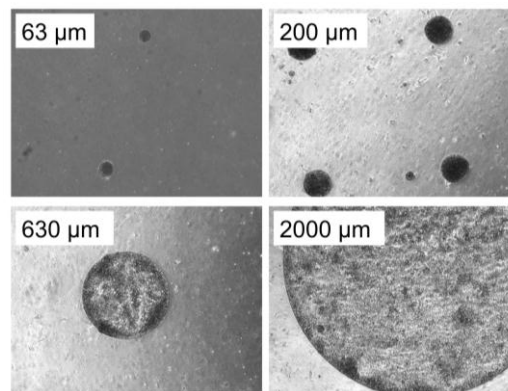


図 2 培養 4 日目の Hep G2 の形態写真

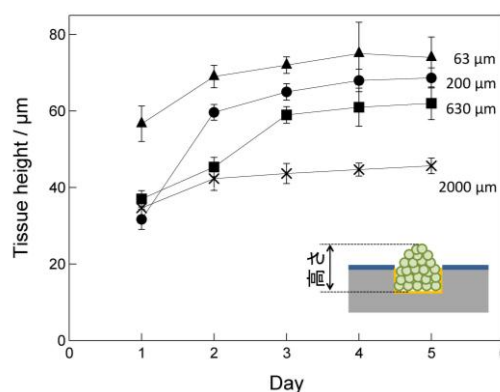


図 3 培養日数に対する細胞組織の高さ変化

亢進させた場合、亢進させていない場合、の 2 種類について調べた。比較実験として、一般的に広く用いられ、生理学的に妥当な応答を取得できると認知されている 96 ウェルプレートのウェル (直径約 6.4 mm) 内で形成した細胞組織を用いた。図 4 に示したように、3MC による非誘導時では、細胞内の CYP 1A1/2 にはほとんど違いは無く (プロット a)、また、96 ウェルで形成された細胞組織のものとはほぼ同じであった。一方、3MC による誘

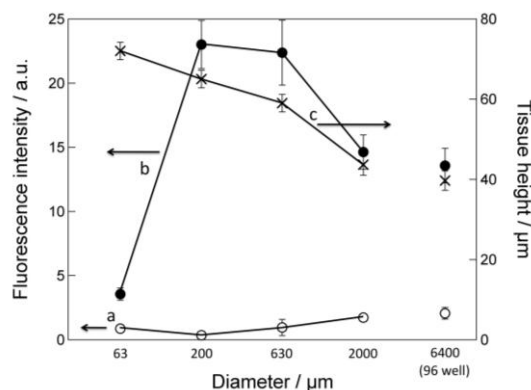


図 4 3MC による (a) 非誘導時および (b) 誘導時の単位面積当たりの CYP 1A1/2 活性と (c) 細胞組織の高さにおける培養 5 日目での細胞組織の大きさ依存性

導時では、直径 200–630  $\mu\text{m}$  の細胞組織で CYP 1A1/2 活性がピークになった (プロット b)。少なくとも、直径 200–630  $\mu\text{m}$  の細胞組織での CYP 1A1/2 活性は、直径 63  $\mu\text{m}$  のものの約 6 倍になった。このような結果が得られた理由は次の通りである。直径 63  $\mu\text{m}$  の細胞組織では、細胞数が不足しているため、肝組織としての機能を発揮できなかったものと推測される。直径 200–630  $\mu\text{m}$  の細胞組織では、Hep G2 が三次元的な構造を形成しているため、個々の細胞間の接着面積が増大する。そのため、細胞間のシグナル伝達が促進されることにより、肝機能も促進されたものと推測される。96 ウェルプレートを含む直径 2000  $\mu\text{m}$  以上の細胞組織では、ほぼ二次元的な構造であるため、個々の細胞間の接着面積が減少するため、三次元構造の細胞組織よりも肝機能が低下したものと推測される。

## (2) 間接変異原の応答性評価

間接変異原の代表例として、アフラトキシン B1 (AFB1) を用いて、細胞組織の毒性評価を行った。発ガン性物質として知られる AFB1 は、CYP 1A1/2 によって代謝されると、反応性の高いエポキシ化 AFB1 を生成する。これが細胞内の DNA やタンパク等と結合することにより、細胞死を引き起こすことが知られている。

したがって、4.1. で得られた結果から、次のことが予測できた。3MC で誘導した細胞組織の AFB1 の用量作用曲線は、誘導していないものよりも低濃度側にシフトする。また、少なくとも直径 63  $\mu\text{m}$  の細胞組織の用量作用曲線は、それよりも大きい細胞組織のものよりも高濃度側にシフトする。

実際に、細胞生存率を指標として、用量作用曲線における細胞組織の大きさ依存性を調べた (図 5)。その結果、予測通り、3MC による非誘導時では、直径 63  $\mu\text{m}$  の細胞組織の AFB1 に対する用量作用曲線は、それよりも大きい直径の細胞組織のものよりもわずかに高濃度側にシフトしているように見えるものの、全ての用量作用曲線はほぼ一致していた。また、96 ウェルの細胞組織のものとも一致した (図 5A)。つまり、3MC 非誘導時では、AFB1 に対する用量作用関係は細胞組織の大きさに依存しなかった。

一方、3MC による誘導時において、直径 200  $\mu\text{m}$  以上の細胞組織の AFB1 に対する用量作用曲線は、直径 63  $\mu\text{m}$  の細胞組織のものよりも明らかに低濃度側にシフトした (図 5B)。また、96 ウェルプレートの場合も含む直径 200  $\mu\text{m}$  以上での用量作用曲線は全て一致した。なお、3MC 誘導時での直径 63  $\mu\text{m}$  の用量作用曲線は、3MC 非誘導時のものとほぼ一致した。このことから、3MC 誘導時では、AFB1 に対する用量作用関係は、細胞

組織の大きさに依存することが明らかになった。

以上の結果から、生理学的に妥当な応答を取得するためには、必要十分な細胞数が存在することが明らかになった。したがって、Hep G2 のみで形成した細胞組織を用いて生理学的に妥当な応答を取得する場合、少なくとも直径 200  $\mu\text{m}$ 、高さ約 60  $\mu\text{m}$  の細胞組織を用いるべきである。このときの細胞数を概算すると、Hep G2 細胞を直径 20  $\mu\text{m}$  の球体と仮定した場合、約 500 個に相当する。この数字は、96 ウェルプレートの 1 ウェル内に高密度で単層の細胞が存在するときの細胞数の 500–1000 分の 1 に相当するため、例えば動物から抽出した細胞を用いる場合、動物の使用数削減にもつながるものと期待される。一方、以前に二次元の Hep G2 細胞組織で検討したところ、生理学的に妥当な応答を示した細胞組織の直径は少なくとも 630  $\mu\text{m}$  の大きさを必要とし、このときの細胞数は約 1000 個であった。これらの数値を比較すると分かるとおり、三次元構造の細胞組織は二次元構造のものよりも少ない細胞数で生理学的に妥当な応答を得られることが明らかになった。

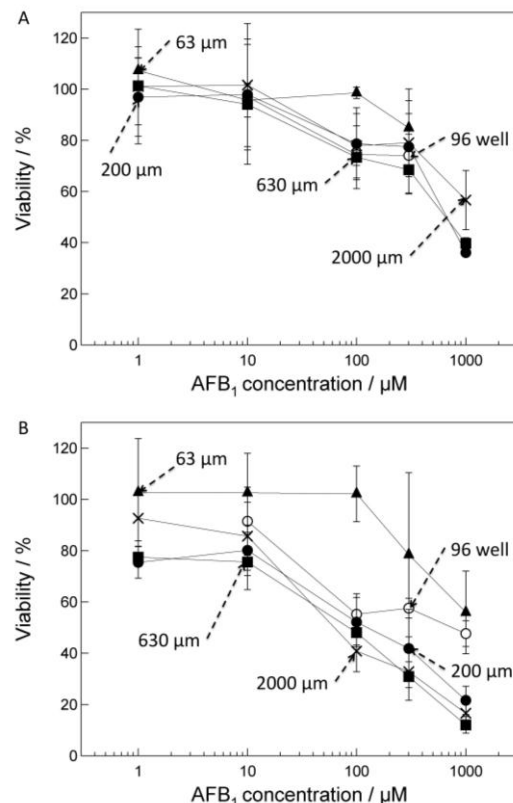


図 5 3MC 非誘導時(A)と誘導時(B)における AFB1 に対する用量作用曲線の細胞組織の大きさ依存性

## (3) ハニカム型 PDMS テンプレートを用いたラット初代成熟肝細胞の凝集体形成と毒性試験への利用



ウェルの大きさが異なるハニカム型 PDMS テンプレート(六角形の1辺が約44、73、115、188  $\mu\text{m}$ ) にラット成熟初代肝細胞を播種したところ、培養2日目に凝集体が得られた。ここで得られた凝集体の直径はおおよそ  $56 \pm 4$ 、 $86 \pm 6$ 、 $139 \pm 8$ 、 $243 \pm 4 \mu\text{m}$  であった。

次に、培養2日目での細胞1個あたりの凝集体内の CYP 1A1/2 活性を、EROD 法を用いて調べた(図6)。その結果、一般的に広く用いられ、生理学的に妥当な応答を取得できると認知されている 96 ウェルプレートのウェル(直径約 6.4 mm) 内で形成させた細胞組織と比較したところ、直径 56  $\mu\text{m}$  の凝集体の活性は約2倍になった。しかしながら、凝集体のサイズが大きくなるほど、細胞1個あたりの CYP 1A1/2 活性が低くなった。この結果は、4.1 の結果の傾向と異なるものであった。この理由として、本計測で使用した細胞内の CYP 1A1/2 活性を調べる方法に起因している可能性がある。ここでは、凝集体に EROD を暴露し、CYP 1A1/2 によって代謝されて凝集体の外に放出された ER 濃度を計測した。したがって、EROD や ER の凝集体内外への拡散が律速になっているからかもしれない。

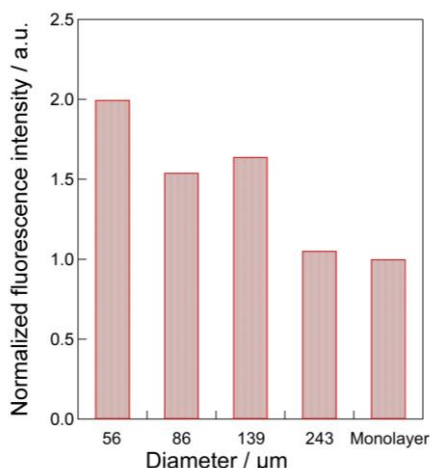


図6 DNA 当りの CYP 1A1/2 活性に対する培養1日目での細胞組織の大きさ依存性

一方、AFB1 に対する毒性も調べた。ここでは、直径 46 と 139  $\mu\text{m}$  の凝集体を用いた(図7)。その結果、直径 139  $\mu\text{m}$  の凝集体の用量作用曲線は、直径 46  $\mu\text{m}$  のものよりも低濃度側にシフトしていた。これは、直径 139  $\mu\text{m}$  の凝集体が直径 46  $\mu\text{m}$  のものよりも組織化していたものと推測される。この傾向は、4.2 と同様であった。しかしながら、AFB1 の毒性は通常、CYP 1A1/2 によって代謝された後にさらに強くなることから、図6のと矛盾することになる。この理由は明確になっていない。したがって、細胞内の CYP 1A1/2 活性の計測を最適化が必要なのかもしれない。

い。

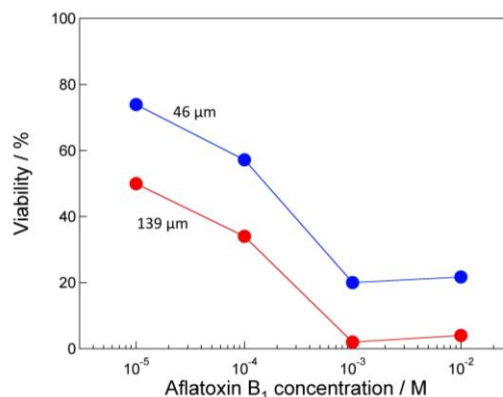


図7 AFB1 に対する用量作用曲線のラット成熟初代肝細胞凝集体の大きさ依存性

#### (4) 細胞凝集体の非侵襲評価系の構築

まず、ハンギングドロップ法で、100 個の Hep G2 細胞から1個の凝集体を作製した。このとき、時間の経過とともに、凝集体は大きくなり、凝集体1個あたりの細胞数は1000~2000 個(直径約 200  $\mu\text{m}$ ) になった。ここで得られた1個の凝集体を、1つのマイクロウェル内に入れてさらに培養した。少なくとも5日間、凝集体が壊れることなく培養できた。

次に、PtOEP ( $\lambda_{\text{ex}} = 540 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 640 \text{ nm}$ ) の発光を観察した。凝集体を入れて培養5日目でのマイクロウェル底面と、空のマイクロウェルの底面の光イメージング画像を図8に示した。この結果から、Hep G2 存在下でのマイクロウェル底面は明らかに発光していた。また、呼吸代謝を阻害するシアン化物を添加すると、消光することも確認できた。これらことから、発光強度はマイクロウェル内の酸素濃度に起因することが考えられる。Hep G2 存在下では、細胞呼吸に基づく酸素消費速度がマイクロウェル内への酸素の拡散速度よりも速くなったため、マイクロウェル底面の酸素濃度が低下し、PtOEP の発光が酸素によって消光されなかったものと推察される。したがって、本センシング法を利用すれば、細胞凝集体の有害物に対する応答を、非侵襲的に評価できるものと期待される。



図8 培養5日目の Hep G2 凝集体の位相差顕微鏡画像とそのときのマイクロウェル底面および空のマイクロウェル底面の蛍光イメージング画像

以上よりここで得られた知見は、ヒト正常肝などの貴重な細胞を用いてスクリーニングを行う場合、限られた細胞数から多くの情報を取得するのに役立つものと信じている。また、動物から細胞を採取する場合、使用動物数の削減にもつながるものと期待される。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

- ① K. Komori, S. Fujii, K. Montagne, H. Nakamura, H. Kimura, K. Otake, T. Fujii, and Y. Sakai, “Development of the Well of the Well System-Based Embryo Culture Plate with an Oxygen Sensing Photoluminescent Probe”, *Sens. Actuators B*, **2012**, 162, 278-283 (DOI: 10.1016/j.snb.2011.12.078).

〔学会発表〕(計14件)

- ① 小森喜久夫、藤井 翔、モンターニュ・ケビン、中村寛子、木村啓志、藤井輝夫、酒井康行、“光イメージングによる受精卵の品質モニタリング用ウェル/ウェル型培養プレートの開発”、日本動物実験代替法学会第24回大会、宮城県建設産業会館、11月11日(2011年)
- ② M. Shinohara, K. Komori, H. Kimura, K. Montagne, T. Fujii, and Y. Sakai, “Rapid and High Cell-Density Formation of Three-Dimensional Pancreatic  $\beta$ -cell and Liver Cell Aggregates Using Oxygen Permeable Honeycomb Micro-well Sheet”, International Conference on Biofabrication 2011, Toyama, Japan, October 7th (2011).
- ③ K. Komori, N. Yamamoto, H. Matsui, S. Takeuchi, and Y. Sakai, “Use of Liver Microsome S9 Fraction-Containing Microcapsules to Include Liver Biotransformation Processes in Cytotoxicity Tests”, VIII World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Montreal, Canada, August 24th (2011).
- ④ M. Shinohara, K. Montagne, K. Komori, T. Fujii, and Y. Sakai, “Rapid Formation of Highly Cell-Dense Three-Dimensional (3D) Pancreatic  $\beta$ -Cell and Liver Cell Aggregates Using Oxygen Permeable Micro-Well Sheets”, Asian Congress on Biotechnology, Shanghai, China, May 14th (2011).
- ⑤ 篠原満利恵、小森喜久夫、藤井輝夫、酒井康行、“酸素透過マイクロウェルを用いた極小肝・膵・細胞組織の効率的構築” 化学工学会第76年会、東京農工大学、3月24日(2011年)
- ⑥ 篠原満利恵、小森喜久夫、藤井輝夫、酒井康行、“酸素透過マイクロウェルを用いた肝細胞・膵・細胞凝集体の効率的再構築”、第10回日本再生医療学会総会、京王プラザホテル、3月2日(2011年)
- ⑦ 篠原満利恵、小森喜久夫、藤井輝夫、酒井康行、“酸素透過マイクロウェルを用いた膵島様凝集体の効率的再構築と大きさ依存性評価”、日本動物実験代替法学会第23回大会、北里大学、12月4日(2010年)
- ⑧ 小森喜久夫、鈴木宏明、藤井輝夫、酒井康行、“毒性評価系に利用可能な3次元肝組織の極小化”、日本動物実験代替法学会第23回大会、北里大学、12月4日(2010年)
- ⑨ 小森喜久夫 “In vitro 毒性試験系に有用な最小細胞集団の構築と機能評価”、日本動物実験代替法学会第23回大会、北里大学、12月4日(2010年)(依頼講演)
- ⑩ K. Komori “Cell-based Bio-Device for Alternative to Animal Experiments”, Lecture, Shanghai Ocean University (Shanghai, China), June 29th (2010). (招待)
- ⑪ K. Komori “Cell-based Bio-Device for Alternative to Animal Experiments”, Lecture, Tongji University (Shanghai, China), June 28th (2010). (招待)
- ⑫ 小森喜久夫、山本尚子、松井 等、中山秀謙、竹内昌治、酒井康行、“肝ミクロソーム内包ゲル微粒子の作製と細胞アッセイへの利用”、第17回HAB研究機構学術年会 創薬とヒト組織利用-薬効と副作用予測への挑戦-『細胞工学からのメッセージ』、昭和大学、5月21日(2010年)
- ⑬ 小森喜久夫、鈴木宏明、亀田一平、立間徹、藤井輝夫、酒井康行、“In vitro バイオアッセイに利用可能な2次元および3次元肝細胞組織の極小化限界の探索”、第17回HAB研究機構学術年会 創薬とヒト組織利用-薬効と副作用予測への挑戦-『細胞工学からのメッセージ』、昭和大学、5月21日(2010年)
- ⑭ 酒井康行、鈴木宏明、木村啓志、藤井輝夫、小森喜久夫、“マイクロウェル構造を利用した3次元肝細胞組織の構築とその極小化限界の探索”、第10回東京大学生命科学シンポジウム-Todai BIO 2010-、東京大学、5月1日(2010年)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

小森 喜久夫 (KOMORI KIKUO)  
東京大学・生産技術研究所・助教  
研究者番号：60431813