

動物組織を薄切した切片担体及びコラーゲンビトリゲル薄膜担体を利用した 培養モデルの特徴と創薬研究への応用構想

竹澤俊明, ^{*,a} 竹内朋代, ^a 柳原佳奈, ^{a,b} 中沢有紀子, ^{a,c}
二谷 綾, ^{a,d} 寺田 聡, ^b 落谷孝広, ^e 上野光一^c

Advantages of Culture Models Utilizing Substrata Made of TOSHI (Tissue/Organ Sections for Histopathology) or Collagen Vitrigel Membrane and Their Application Concept for Drug Development Researches

Toshiaki TAKEZAWA, ^{*,a} Tomoyo TAKEUCHI, ^a Kana YANAGIHARA, ^{a,b} Yukiko NAKAZAWA, ^{a,c}
Aya NITANI, ^{a,d} Satoshi TERADA, ^b Takahiro OCHIYA, ^e and Koichi UENO^c

^aTransgenic Animal Research Center, National Institute of Agrobiological Sciences, 2 Ikenodai, Tsukuba City 305-0901, Japan, ^bFaculty of Engineering, University of Fukui, 3-9-1 Bunkyo, Fukui City 910-8507, Japan,

^cFaculty of Pharmaceutical Sciences, Chiba University, 1-8-1 Inohana, Chuo-ku, Chiba 260-8675, Japan,

^dScitech Division, Life Science Center, Asahi Techno Glass Co., 1-50-1 Gyoda, Funabashi City 273-0044, Japan, and ^eSection for Studies on Metastasis, National Cancer Center Research Institute, 5-1-1 Tsukiji, Chuo-ku, Tokyo 104-0045, Japan

(Received August 1, 2007)

To create new *in vitro* culture models for extrapolating the cell response *in vivo*, we attempted to devise culture substrata of anchorage-dependent cells. The first substratum, tissue/organ sections for histopathology (TOSHI)-substratum was found to conserve both tissue composition and microarchitecture in an *in vivo* environment. Collagen vitrigel membrane, the second substratum investigated, possesses excellent strength and protein permeability. Both substrata were developed and utilized for the culture of various anchorage-dependent cells. TOSHI-substratum prepared from regenerative mouse livers after carbon tetrachloride intoxication efficiently induced the differentiation of mouse embryonic stem cells into hepatocyte-like cells. Also, the time-course cell behavior of two different cell lines on various TOSHI-substrata prepared from rat mature organs was successfully converted into a three-dimensional graph chart, *i.e.* a mathematical model. These data suggest that the analysis of interactions between different cell types and various TOSHI-substrata will play an important role for a novel approach to study both cellomics and histomics. Meanwhile, the collagen vitrigel membrane is easy to handle by forceps, resulting in double surface-culture of different cell types by the manipulation of two-dimensional cultures. In the crosstalk model between PC-12 pheochromocytoma cells and L929 fibroblasts, nerve growth factor secreted from L929 cells permeated the collagen vitrigel membrane and induced neurite outgrowth of PC-12 cells *via* a paracrine effect. Furthermore, the function of rat primary hepatocytes was well maintained on the collagen vitrigel membrane. These data suggest that the collagen vitrigel membrane-substratum has many advantages for the reconstruction of culture models.

Key words—cell response; culture substratum; three-dimensional culture; collagen vitrigel

^a農業生物資源研究所遺伝子組換え家畜研究センター (〒305-0901 つくば市池の台 2), ^b福井大学工学部 (〒910-8507 福井市文京 3-9-1), ^c千葉大学大学院薬学研究院 (〒260-8675 千葉市中央区亥鼻 1-8-1), ^d旭テクノグラス㈱サイテック事業部 (〒273-0044 船橋市行田 1-50-1), ^e国立がんセンター研究所がん転移研究室 (〒104-0045 東京都中央区築地 5-1-1)

*e-mail: t.takezawa@affrc.go.jp

本総説は、日本薬学会第 127 年会シンポジウム S45 で発表したのを中心に記述したものである。

1. はじめに

15 年ほど前に Langer と Vacanti が細胞とその足場となる材料から三次元の組織を再構築する組織工学の学際領域を提唱¹⁾したのち、幹細胞生物学の急速な発展も相まって、組織を再生する三次元培養技術は再生医療の基盤技術として著しく展開している。²⁻⁴⁾ しかしながら、このような三次元培養技術は移植用の組織を創出することが主目的であるので、薬学領域ではかならずしも普及するに至ってい

ない。

それでは、創薬研究のツールとしては、どのような三次元培養モデルが開発されれば活用できるのだろうか。創薬研究は生理活性物質の探索に始まり、薬効及び毒性の評価、そのメカニズム解析、生産、そしてドラッグデリバリーシステム（DDS）の構築と多岐に渡る。したがって、創薬研究に有用な培養モデルの条件を一概に述べることは難しいが、共通することは動物の生体を利用した実験と比較して目的とする生体内（究極はヒト）の細胞応答を効率的に外挿できること、さらに、複雑な培養操作を必要とせず容易かつ安全に扱えてコストパフォーマンスにも優れていることであると考えられる。

Takezawa は細胞の足場（生体内：細胞外マトリックス、生体外：培養担体）を人為的に操作した際に生じる細胞の挙動及び形質発現に着眼した研究を一貫して行い、生体内細胞環境の再現に有用な三次元培養モデルを構築する6つの基盤技術：1) ヘテロスフェロイドの培養技術、⁵⁾ 2) 培養液の通液培養技術、⁶⁾ 3) 器官工学の培養技術、⁷⁾ 4) 切片利用の培養技術、⁸⁾ 5) ビトリゲル利用の培養技術、⁹⁾ 6) シルク利用の培養技術¹⁰⁾を独自の発想で開発してきた。

1)-3)の技術開発では理想的なオルガノイド（器官様構造体）を再構築する多機能性培養担体の概念を確立できたが、いずれも熟練を要する基盤技術のシーズであって応用分野の具体的なニーズに対応していなかったため、実用化には至っていない。そこで、4)-6)の技術は培養操作が単純であって、かつ期待できる効果が明解であることを意識して開発した。¹¹⁾特に4)と5)の技術では培養担体として、それぞれ生体内の疑似環境を創出する構想^{12,13)}に基づいて開発した「動物組織を薄切した切片担体」と「コラーゲンビトリゲル薄膜担体」を利用しており、「コラーゲンビトリゲル薄膜担体」については既に製品化にも成功している。最近の研究では、これらの担体上で培養した細胞が生体内に酷似した細胞応答を示すことが分かってきた。本稿では、これらの担体を開発した経緯、担体の作製とその担体を利用した培養技術の特徴、最近の研究進展、さらに創薬研究のツールとしての応用構想について述べる。

2. 動物組織を薄切した切片担体の開発経緯¹⁴⁾

細胞の生死、付着形態、接着伸展、増殖、分化、極性呈示、移行浸潤、及び自己組織化などの挙動を

制御するために、生物素材、人工素材、あるいは両者を組み合わせたハイブリッド素材を種々の形状に加工した様々な培養担体が開発されてきた。²⁾しかしながら、生体組織の複雑な構造と成分の双方を反映した培養担体は未開発であった。そこで、組織病理学の分野では染色による形態観察を目的として日常的に作製される「動物組織を薄切した切片」に着眼した。なぜなら、切片には生体組織の微細構造のみならず抗体や核酸プローブで検出されるように様々な生体分子が部域特異的に残存している。また、以下の2つの研究報告から、細胞は培養担体の成分や構造を認識して挙動を決定することが分かる。1つは、神経細胞はタンパク質をプロットしたニトロセルロース膜上で培養すると、神経成長因子（NGF）のバンドに相当する部域で選択的に生存するという報告である。^{15,16)}この報告は、複合不均一成分から作製した培養担体上で培養した細胞が、特定分子の活性を認識して挙動を決定できることを示唆している。もう1つは、細胞はパターンなどの幾何学的な微細構造を認識して挙動を決定できるという報告である。^{17,18)}そこで、動物組織を薄切した切片を細胞の培養担体に応用することで、切片に介在している部域特異的な微細構造や生体成分に依存したシグナルを培養細胞に伝達できるのではないかと考えた。

3. 切片担体の作製とその担体を利用した培養技術の特徴¹⁹⁾

切片担体は、1) 病理学の実験手技に従って凍結組織、パラフィン包埋組織、あるいは光顕用樹脂包埋組織を作製したのちにマイクロトームで約5 μ m（組織によって2-20 μ m）の厚さに薄切してスライドガラス上に伸展する、2) 免疫組織学の実験手技に従ってスライドガラス上に伸展した切片より凍結包埋剤やパラフィンを除去したのちにリン酸緩衝生理食塩水（PBS）で平衡化する、3) 必要に応じて



竹澤俊明

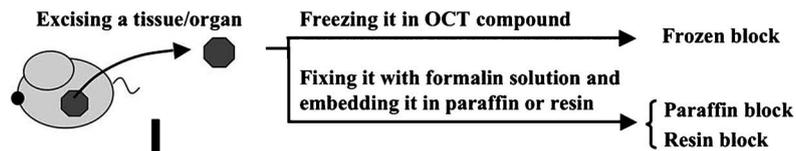
佃農業生物資源研究所主任研究員。1962年東京都生まれ。東京薬科大学薬学部卒業。千葉大学で博士（薬学）学位取得。1986年より企業4社の研究員を経て、1999年国立精神神経センター神経研究所流動研究員、2000年農林水産省畜産試験場主任研究官、2001年独法化による改組で所属変更、現在に至る。動物細胞の足場に注目した組織再生工学の研究に従事。

切片に介在する因子の賦活化や変性などの処理を施す（酵素や抗体などによる生物学的、界面活性剤などによる化学的、若しくは熱や紫外線などによる物理学的な処理）、4) スライドガラスの切片付着面上にして適当な培養容器に移し入れたのちに抗生物質含有の PBS あるいは 70%エタノールで滅菌する、そして、5) 培養液に置換することにより作製できる。ここで切片担体は、ヒトを含む様々な動物のあらゆる組織、つまり正常のみならず発生や再生の過程にある組織、あるいは病巣組織からでも作製できる。細胞培養実験は、上述のように準備した切片担体上に細胞懸濁液を播種することで開始し、そ

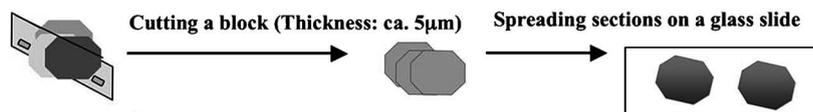
の後は経時的に部域特異的な細胞の接着、増殖、分化などの挙動を解析することで展開する (Fig. 1)。

当初の研究では、ウシ胎盤の凍結組織より作製した切片担体上で、異なる 4 種類の細胞（ヒト絨毛がん細胞株である BeWo 細胞、ウシ肺動脈血管内皮細胞株である CPAE 細胞、正常ヒト新生児包皮皮膚線維芽細胞である NHDF 細胞、及びラット褐色細胞腫である PC-12 細胞）を培養した。その結果、胎児側胎盤領域では BeWo 細胞のスフェロイド（多細胞性球状凝集塊）、CPAE 細胞の毛細血管網様構造、及び PC-12 細胞の神経網様構造を形成する細胞の分化誘導が観察された。また切片担体に

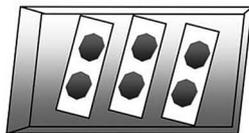
Preparation of a frozen, a paraffin-embedded, or a resin-embedded tissue/organ



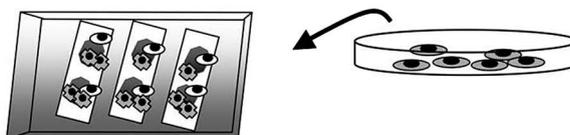
Preparation of TOSHI(tissue/organ sections for histopathology)-substratum



Optimization of the TOSHI-substrata for cell culture



Seeding and culturing cells on the TOSHI-substrata



Analysis of the location-specific cell behavior

Fig. 1. Schematic Illustration for the Preparation of TOSHI-substratum and a Technical Advantage for Culturing Cells on It

は、無血清培養で誘導される PC-12 細胞のアポトーシスを阻害して細胞生存率を維持する活性があった。さらに、ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) で脱細胞化処理した切片担体上に NHDF 細胞を培養して、担体由来の細胞外マトリックス成分を巻き込んだ三次元組織を再構築する技術を確立した。つまり、培養細胞と切片培養担体の組み合わせ方を工夫することで、細胞の分化誘導や無血清培養、有用生理活性物質の探索や生産、細胞特性の解析、遺伝子機能の予測、及び組織再生などの応用研究が展開できることが示唆された。⁸⁾

4. 切片担体を利用した最近の研究進展

切片担体を利用して、生体内の細胞応答を外挿する培養モデルを構築することは可能であろうか。この課題を解決するために、次の研究を展開した。四塩化炭素で軽度の肝障害を惹起したのちの肝再生状態にあるマウスに、尾静脈よりマウス胚性幹細胞 (以下、ES 細胞) を投与すると、ES 細胞は肝臓に移行したのちに生着して肝細胞に分化することが報告されている。²⁰⁾ そこで、この四塩化炭素を投与したのちの肝組織より切片担体を作製して ES 細胞を培養することで、ES 細胞の肝細胞への分化が誘導できるか否かを検討した。具体的には、四塩化炭素を投与したのちの障害あるいは再生の様々なステージにある肝組織より作製した切片担体上で ES 細胞を培養することで、接着、増殖及び肝細胞への分化を検証した。その結果、ES 細胞の経時的な挙動は、切片担体に用いた肝組織の状態により異なるこ

とが分かった。障害進行過程の肝組織より作製した切片担体上で培養した ES 細胞は丸い形態を示し、接着率と分化効率とはともに低かった (Fig. 2(A))。一方、再生進行過程の肝組織より作製した切片担体上で培養した ES 細胞は敷石状に伸展し、接着率が高かった (Fig. 2(B))。特に再生活性の強い四塩化炭素投与後 4 日目の切片担体上では、培養 24 時間目までに約 4 倍に増殖する細胞集団が認められ、索状構造を形成した細胞集団や二核細胞も存在した (Fig. 2(C))。また、この 4 日目の切片担体上では、培養 24 時間目までに約 70% の接着細胞がアルブミンを発現し、培養 48 時間目には培養液中へのアルブミン分泌、さらに培養 62 時間目には CYP1A1 活性も確認された。つまり、再生過程の肝組織より作製した切片担体を利用することで、ES 細胞を短時間で効率よく肝細胞様細胞へ分化誘導できることが明らかとなった。²¹⁾

また、切片担体と培養細胞の組み合わせは多種多様であるので、将来的には相互作用の解析結果を集積したデータベースを構築することが重要になると考えた。¹⁹⁾ そこで、切片-細胞間の相互作用データベースを構築する第一段階として、数種類の臓器より作製した切片担体上で異なる 2 種類の細胞の挙動を解析したのちに、解析データの数理モデル化を試みた。具体的には、ラットより摘出した各臓器 (大脳、胸腺、心臓、腎臓、精巣、肝臓、など) より切片担体を作製したのち、ラットインスリノーマ細胞株である RIN5F 細胞及びヒト肝がん細胞株である

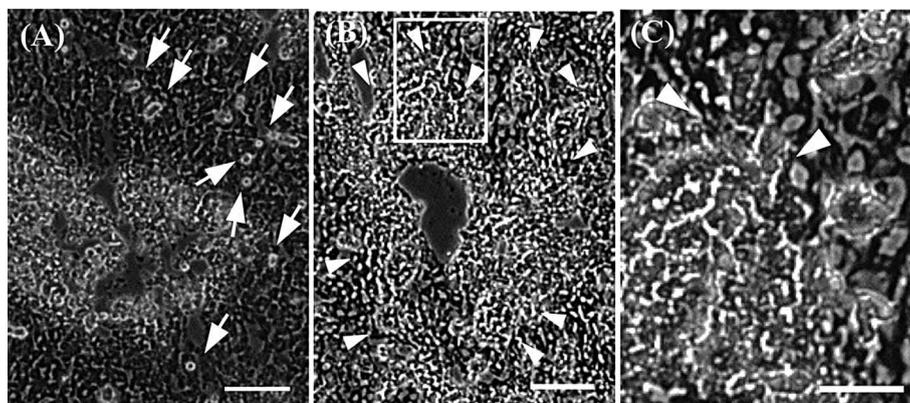


Fig. 2. Phase-contrast Microscopic Observations of ES Cells Cultured on TOSHI-substrata Prepared from Livers after CCl_4 -administration into Mice

The livers were excised from mice at day 2 (A) and day 4 (B and C) after CCl_4 -administration. A rectangular region enclosed with lines in (B) is magnified in (C). Arrows and arrowheads represent typical round cells and polygonal cell colonies formed trabecular arrays, respectively. Bars represent 100 μm in (A and B) and 50 μm in (C).

HepG2 細胞を培養した. それぞれの切片担体と培養細胞の組み合わせ毎に経時的な細胞増殖及び分化機能 (培養液中に分泌されるインスリン又はアルブミン量) を解析し, 得られたデータを三次元グラフとして表記した. その結果, 数理モデル化した細胞挙動のプロファイルは, 細胞が同じでも切片に用いた組織に依存して異なること, また切片に用いた組織が同じでも細胞に依存して異なることを実証した (投稿論文準備中). このことは, 1つの組織に由来する切片担体を利用して異なる多数の細胞株を網羅

的に解析するセロミクス研究と, 1つの細胞株を利用して異なる多数の組織に由来する切片担体を網羅的に解析するヒストミクス研究が可能になることを示唆する (Fig. 3). 今後, 組織切片と細胞の相互作用プロファイルを集積したデータベースが構築できれば, 「特性を診断したい細胞と特性既知の組織切片」又は「特性を診断したい組織切片と特性既知の細胞」を組み合わせ培養して得られる細胞挙動プロファイルデータベースへフィードバックすることで新しい診断システムが創出できると考えてい

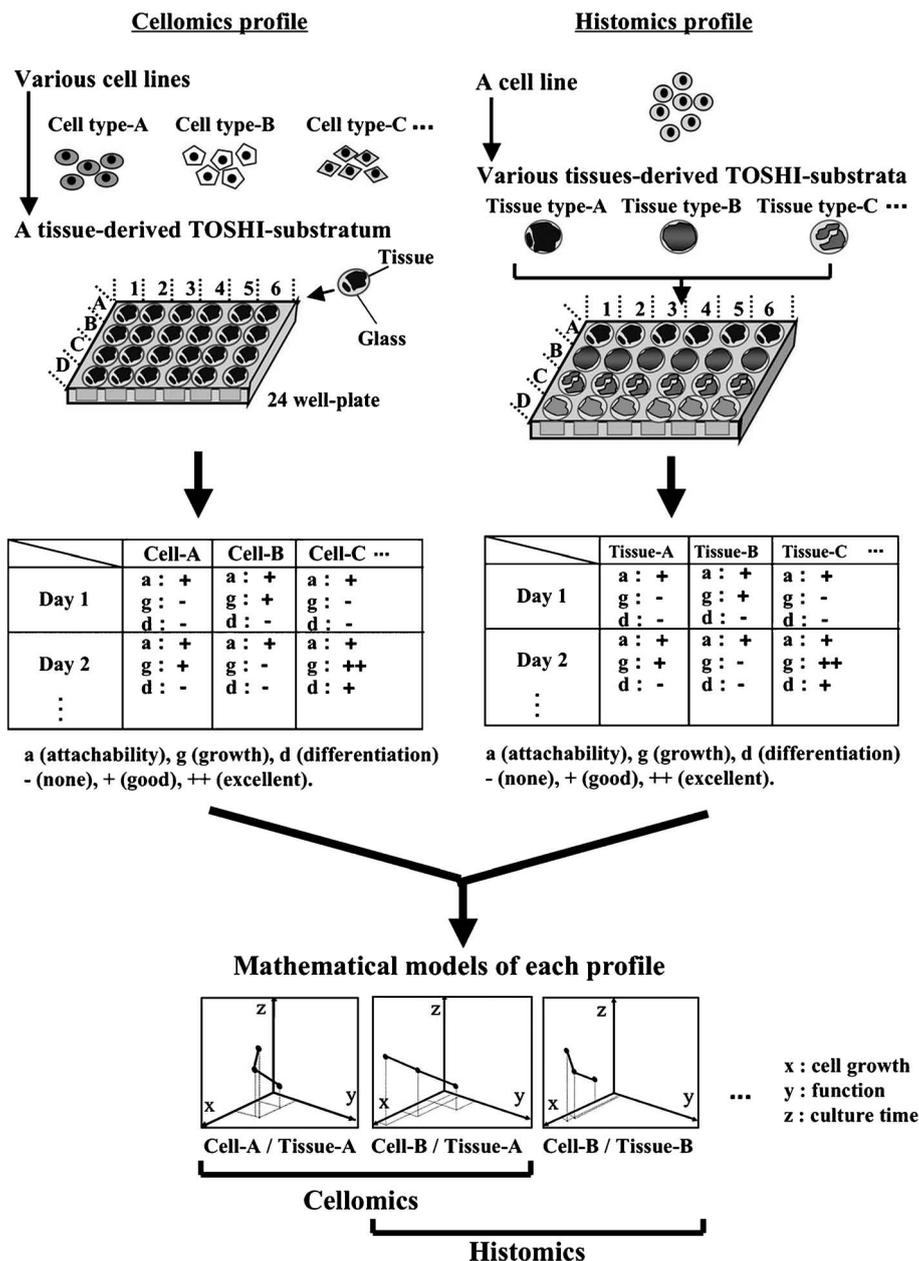


Fig. 3. A Novel Concept for Constructing Mathematical Models to Facilitate Studies on Cellomics and Histomics

る。¹⁹⁾

5. 創薬研究のツールとして切片担体を利用した培養モデルを活用する構想

切片担体を利用した培養モデルは、生理活性物質の探索、あるいは薬効及び毒性の評価などの創薬研究に活用できると考えている。生理活性物質の探索では、特定の細胞が切片の特定部域で接着、増殖(阻害)、分化などの細胞応答特性を示す培養モデルの特徴を利用して、特定部域からリガンド、増殖(阻害)因子、分化誘導因子などの生理活性物質を単離する研究が展開できる。

また、薬効及び毒性の評価では、動物実験代替法として有用な培養モデルを以下のように構築できる。通常用いる切片担体は厚みが5 μm なので、厚みが1 cmの組織であれば2000枚の切片担体を作製することができる。また、実験動物一個体に化学物質を投与すれば、化学物質の薬効あるいは毒性を反映した切片担体は標的器官のみならず全身の諸器官からも作製することができる。したがって、実験動物一個体を有効に活用して多数の切片担体を作製し、切片担体に介在する薬効あるいは毒性を様々な培養細胞の挙動で解析する新しい組織培養システムの構築が期待できる。ひいては特定の化学物質を投与した同じ実験動物に由来する切片担体を、複数の異なる研究機関でバリデーションに利用することも期待できる。さらに、切片担体は実験動物のみならずヒトの様々な生検材料からも作製できる。つまり、切片担体を利用した薬効及び毒性の試験モデルは、実験動物の削減、あるいは置き換えの観点から有用な代替法になると考えられる。¹²⁾

6. コラーゲンビトリゲル薄膜担体の開発経緯¹²⁾

生体内の各々の器官では、細胞系譜を異にする2種類以上の接着依存性細胞が細胞外マトリックスを足場として秩序正しく三次元的に集積し、間質液を介してパラクライン的な相互作用を及ぼし合うことによって、特定の生理機能を発揮している。しかしながら、動物細胞の培養技術は1種類の細胞による二次元培養系が主流であり、2種類以上の異種細胞を用いた三次元培養系は普及していないのが現状である。その理由は、三次元培養は二次元培養と比較すると培養工程が複雑で操作に熟練を要する、位相差顕微鏡による細胞観察が困難あるいは不可能である、播種した細胞の三次元分布は不均一になり易く

再現性に劣る、培養液の交換あるいは共培養する異種細胞の播種に伴う無菌操作が困難であるなど、既存の三次元培養技術には数々の欠点があるためである。したがって、これらの問題点を改善すれば、生体内器官モデルとなる三次元培養技術を容易に作製できると考えた。^{22,23)}

コラーゲンをういた三次元培養技術は、血管新生モデル、²⁴⁾ がん浸潤モデル、²⁵⁾ 結合組織モデル、²⁶⁾ 及び皮膚などの上皮-間充織モデル²⁷⁾などの再構築に有用であるが、上述の欠点があるために幅広く普及するには至っていない。一方、ゆで卵の白身など熱変性タンパク質は、乾燥により自由水のみならず結合水も徐々に除去することで、強度と透明性に優れたガラス様の物性に変換できることが知られている。²⁸⁾ そこで、このガラス化の概念を柔らかく不透明で取り扱いが困難な従来のコラーゲンゲルに応用することで、強度と透明性に優れた物性に改善できないかと考えた。さらに、最終目的は細胞を培養することにあるので、乾燥によるガラス化のちに再水和する必要があると考えた。

7. コラーゲンビトリゲル薄膜担体の作製とその担体を利用した培養技術の特徴

ビトリゲル(vitrigel)は新しく提唱した学術用語で、ガラス化(vitrification)の工程を経て作製できる安定した状態のゲルのことである。コラーゲンビトリゲルは、3段階の工程を経て作製できる。まず、コラーゲンゾルに生理的な塩濃度、水素イオン濃度、及び温度を付与することでゲル化する。次に、ゲル化したコラーゲンゲル内の自由水を除去したのちに、結合水も徐々に除去してガラス化する。さらに、ガラス化した乾燥コラーゲンを再水和することにより、コラーゲンビトリゲルが作製できる(Fig. 4(A))⁹⁾。なお、コラーゲンビトリゲルの形状はコラーゲンゾルをゲル化する際の鋳型の形状を工夫することで、薄膜、糸及びチューブなど任意の形状のコラーゲンビトリゲルを作製することができる。このコラーゲンビトリゲルは、生体内の結合組織とほぼ同様の極めて高いコラーゲン線維密度[10-25(w/v)%]を有し、強度、透明性、及びタンパク質透過性に優れている。^{9,29)}

また、コラーゲンゾルには様々な可溶性物質あるいは不溶性物質を添加できるので、添加した物質の特性をコラーゲンビトリゲルに反映できる。特に、

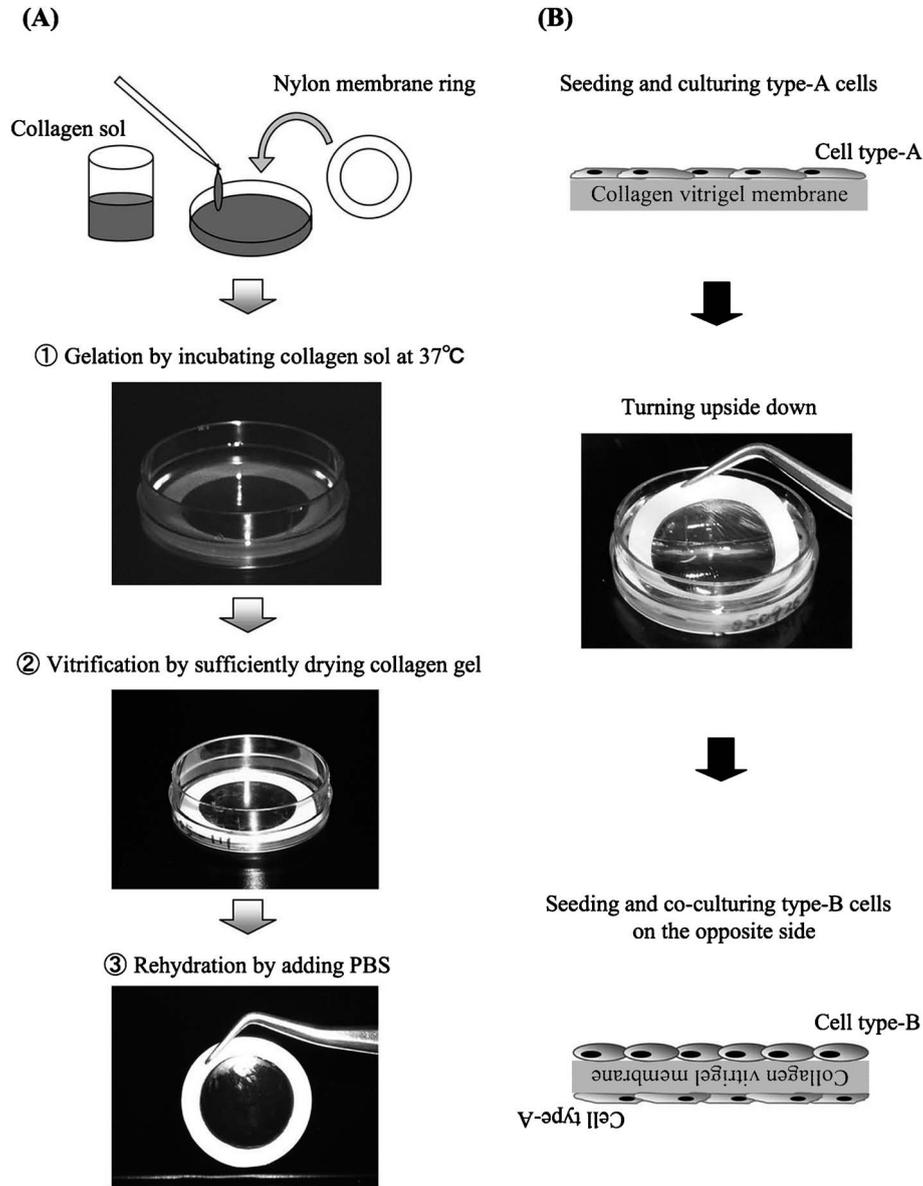


Fig. 4. Schematic Illustration for the Preparation of a Collagen Vitrigel Membrane Substratum and a Technical Advantage for Culturing Cells on It.

(A) Preparation process of the collagen vitrigel membrane. (B) Procedure for three-dimensionally culturing two different types of cells *via* the collagen vitrigel membrane substratum.

環状ナイロン膜支持体を包埋したコラーゲンビトリゲル薄膜は、ピンセットで容易に扱えるので動物細胞の培養担体として極めて有用であることが分かり、既に製品化に成功している。具体的には、環状ナイロン膜支持体付きコラーゲンビトリゲル薄膜担体上に細胞を二次元培養したのちにピンセットで担体を裏返して、担体の裏面には異種細胞を二次元培養することで、上皮間充織やがん血管などの三次元培養モデルを容易に作製することができる。(Fig. 4(B))^{9,29)}

8. コラーゲンビトリゲル薄膜担体を利用した最近の研究進展

上述したようにコラーゲンビトリゲル薄膜担体には二次元培養の技術で担体の両面に異種細胞を容易に三次元培養できる特徴があるので、生体内の細胞応答を外挿する培養モデルとして異種細胞間のパラクライン解析に有用な三次元培養モデルの構築を検討した。具体的には、コラーゲンビトリゲル薄膜を介して NGF を産生するマウス線維芽細胞株の L929 細胞と NGF に反応して神経様突起を伸長する PC-12 細胞を 3 日間に渡り共培養した。ネガテ

イブコントロール実験としては L929 細胞を培養せずに PC-12 細胞のみを培養した。その結果、ネガティブコントロール実験の PC-12 細胞は丸い形態を呈して抗ニューロフィラメント抗体を用いた染色に擬陽性であったのに対して、コラーゲンビトリゲル薄膜を介して L929 細胞と共培養した PC-12 細胞は神経様突起を伸長して抗ニューロフィラメント抗体を用いた染色に陽性となることが分かった (Fig. 5)。したがって、L929 細胞の産生した NGF はコラーゲンビトリゲル薄膜を介して PC-12 細胞にパラクリン作用して、PC-12 細胞の分化を誘導したことが示唆された。³⁰⁾

また、コラーゲンゾルに可溶性物質の血管内皮増殖因子 (VEGF) を混和して作製したコラーゲンビトリゲル薄膜には、VEGF を徐放する活性が認められた。そこで、この VEGF 徐放性コラーゲンビトリゲル薄膜をラットの皮下に移植したところ、周囲組織に毛細血管の新生が誘導されることが分かった。したがって、生理活性物質を混和して作製したコラーゲンビトリゲル薄膜は DDS として活用できることが示唆された。³⁰⁾ 一方、不溶性物質の平面状の繭糸構造体 (平面絹) を包埋したコラーゲンビトリゲル薄膜を、線維芽細胞の三次元培養担体として利用した結果、強度に優れた結合組織の再構築に成功した。³¹⁾

さらに、コラーゲンビトリゲル薄膜を利用してラット初代肝実質細胞 (以下、肝細胞) の機能維持に優れた培養系を開発するために、従来より肝細胞の機能維持が良好であると報告されているサンドイッチ培養法^{32,33)}を改善する研究を展開した。具体的には、肝細胞をコラーゲンビトリゲル薄膜上に播種したのちに、各種細胞外マトリックス成分 (I 型コ

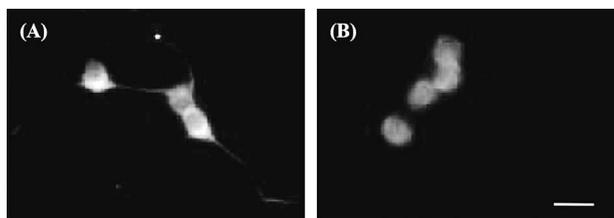


Fig. 5. Immuno-fluorescent Microscopic Observations of PC-12 Cells Stained by Using an Anti-neuro Filaments Antibody.

PC-12 cells were co-cultured with L929 fibroblasts *via* a collagen vitrigel membrane substratum (A) or cultured alone on the substratum (B). Bar represents 25 μm .

ラーゲン, IV 型コラーゲン, マトリゲル) のゾルを重層することでコラーゲンビトリゲル薄膜サンドイッチ培養モデルを作製した。従来のサンドイッチ培養モデル及びコラーゲンビトリゲル薄膜サンドイッチ培養モデルで培養した肝細胞について、経時的に位相差顕微鏡による形態観察, 蛍光顕微鏡による生死判定及びアルブミン分泌量の測定を行った。その結果, 肝細胞の形態はマトリゲルを重層したコラーゲンビトリゲル薄膜サンドイッチ培養モデルでは徐々に球状肝細胞の凝集が進行したが, その他の培養モデルではいずれの肝細胞も 1 週間以上に渡り良好に生存した。アルブミン分泌能は I 型コラーゲンを重層したコラーゲンビトリゲル薄膜サンドイッチ培養モデルが, 1 週間以上に渡り他の培養モデルに比べ高かった。今後, コラーゲンビトリゲル薄膜サンドイッチ培養モデルはピンセットで扱えるのでパームセルのようなチャンバー (生体膜を装着して薬剤の透過性や代謝を解析する 2 相性容器) に簡単に装着できること, また, 肝細胞を培養したコラーゲンビトリゲル薄膜の反対側には類洞内皮細胞を培養できることから, 細胞極性を考慮した代謝産物や栄養消費の研究へ活用できると考えられる (Fig. 6)。したがって, 肝細胞のコラーゲンビトリゲル薄膜サンドイッチ培養モデルは, 生体内微小環境を模倣した動物実験代替法としての発展が期待できる (投稿論文準備中)。

9. 創薬研究のツールとしてコラーゲンビトリゲル薄膜担体を利用した培養モデルを活用する構想

コラーゲンビトリゲル薄膜担体を利用した培養モデルは, 上述したようにコラーゲンビトリゲル薄膜

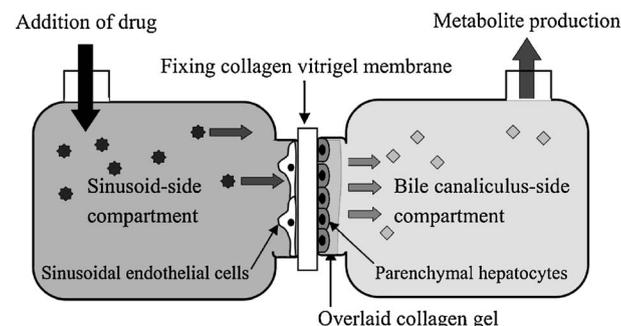


Fig. 6. A Novel Concept for Extrapolating Hepatic Metabolism of Drugs Using a Permcell Culture System for a Liver Organoid Incorporating a Metabolic Pathway from Sinusoid to Bile Canaliculus

担体が低分子のみならず高分子の生理活性物質も透過させたり徐放させることができるので、薬効及び毒性の評価、そのメカニズム解析、あるいはDDSなどの創薬研究に活用できると考えている。特に、支持体付きコラーゲンビトリゲル薄膜担体上に構築した培養モデルはピンセットで容易に取り扱えるので、培養液とともに密封容器に入れた保存や輸送が可能となるだけでなく、上述のようにパームセルに装着することで細胞極性を考慮した薬物の代謝実験も可能となる。したがって、一度に大量に得られる肝実質細胞などの初代細胞は、コラーゲンビトリゲル薄膜担体上で培養した状態で複数の異なる研究機関に輸送してバリデーションに利用することも期待できる。¹²⁾

10. おわりに

創薬研究に有用な三次元培養モデルは、再生医療の基盤技術として発展してきた組織を再生する三次元培養技術を模倣して作製するアプローチがかならずしも最善なのではなく、むしろ生体内の細胞応答を外挿できる簡便な培養技術から創出することが重要であると考えられる。このような観点から、本稿では生体内の疑似環境を創出する構想に基づいて開発した「動物組織を薄切した切片担体」と「コラーゲンビトリゲル薄膜担体」を中心に、それら担体を利用した培養モデルの特徴と創薬研究への応用構想を述べた。今後、創薬研究に有用な三次元培養技術の開発がますます進展して、動物実験代替あるいは薬物の体内動態予測に貢献できる培養モデルが普及することを期待している。

謝辞 本研究の実験助手を担当して下さった島田康子さん、大角由利さんに心より感謝いたします。なお、本研究で行った動物実験については、農業生物資源研究所動物実験委員会の審査及び承認を得たのち、同研究所の動物実験規定に従って行った。

REFERENCES

- 1) Langer R., Vacanti J. P., *Science*, **260**, 920–926 (1993).
- 2) Takezawa T., “Cell Biology for Regenerative Medicine,” ed. by Sekiguchi K., Corona Publishing Co., Ltd., Tokyo, 2007, pp. 183–208.
- 3) Takezawa T., “Recent Progress in Regenera-

- 4) Takezawa T., *Biomaterials*, **24**, 2267–2275 (2003).
- 5) Takezawa T., Yamazaki M., Mori Y., Yonaha T., Yoshizato K., *J. Cell Sci.*, **101**, 495–501 (1992).
- 6) Takezawa T., Yoshizato K., *Tissue Eng.*, **3**, 329–343 (1997).
- 7) Takezawa T., Inoue M., Aoki S., Sekiguchi M., Wada K., Anazawa H., Hanai N., *Tissue Eng.*, **6**, 641–650 (2000).
- 8) Takezawa T., Takenouchi T., Imai K., Takahashi T., Hashizume K., *FASEB J.*, **16**, 1847–1849 (2002).
- 9) Takezawa T., Ozaki K., Nitani A., Takabayashi C., Shimo-Oka T., *Cell Transplant.*, **13**, 463–473 (2004).
- 10) Takezawa T., Ozaki K., Takabayashi C., *Tissue Eng.*, **13**, 1357–1366 (2007).
- 11) Takezawa T., *Biosci. Ind.*, **62**, 375–380 (2004).
- 12) Takezawa T., “Biomaterials and biodevices for alternative methods to animal testing,” eds. by Sakai Y., Tamiya E., CMC Publishing Co., Ltd., Tokyo, 2007 pp. 174–181.
- 13) Takezawa T., *Bio Industry*, 2008 (in press).
- 14) Takezawa T., *Regenerative Med.*, **4**, 39–44 (2005).
- 15) Carnow T. B., Manthorpe M., Davis G. E., Varon S., *J. Neurosci.*, **5**, 1965–1971 (1985).
- 16) Pettmann B., Manthorpe M., Powell J. A., Varon S., *J. Neurosci.*, **8**, 3624–3632 (1988).
- 17) Chen C. S., Mrksich M., Huang S., Whitesides G. M., Ingber D. E., *Science*, **276**, 1425–1428 (1997).
- 18) Chen C. S., Mrksich M., Huang S., Whitesides G. M., Ingber D. E., *Biotechnol. Prog.*, **14**, 356–363 (1998).
- 19) Takezawa T., *Biotechnol. J.*, **5**, 197–200 (2005).
- 20) Yamamoto H., Quinn G., Asari A., Yamanokuchi H., Teratani T., Terada M., Ochiya T., *Hepatology*, **37**, 983–993 (2003).
- 21) Takeuchi T., Ochiya T., Takezawa T., *Tissue Eng.*, 2008 (in press).
- 22) Takezawa T., Ozaki K., Nitani A., Takabayashi C., Shimo-Oka T., *Cell Transplant.*,

- 13, 463–473 (2004).
- 23) Takezawa T., Nitani A., *Kagaku To Seibutsu*, **42**, 713–716 (2004).
- 24) Velazquez O. C., Snyder R., Liu Z. J., Fairman R. M., Herlyn M., *FASEB J.*, **16**, 1316–1318 (2002).
- 25) Kusunoki T., Nishida S., Murata K., Tomura T., *Thyroid.*, **12**, 281–286 (2002).
- 26) Bell E., Ivarsson B., Merrill C., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **76**, 1274–1278 (1979).
- 27) Bell E., Ehrlich H. P., Buttle D. J., Nakatsuji T., *Science*, **211**, 1052–1054 (1981).
- 28) Takushi E., Asato L., Nakada T., *Nature*, **345**, 298–299 (1990).
- 29) Takezawa T., Nitani A., Shimo-Oka T., Takayama Y., *Cells Tissues Organs*, **185**, 237–241 (2007).
- 30) Takezawa T., Takeuchi T., Nitani A., Takayama Y., Kino-oka M., Taya M., Enosawa S., *J. Biotechnol.*, **131**, 76–83 (2007).
- 31) Takezawa T., Ozaki K., Takabayashi C., *Tissue Eng.*, **13**, 1357–1366 (2007).
- 32) Wang Y. J., Liu H. L., Guo H. T., Wen H. W., Liu J., *World J. Gastroenterol.*, **10**, 699–702 (2004).
- 33) Dunn J. C., Yarmush M. L., Koebe H. G., Tompkins R. G., *FASEB J.*, **3**, 174–177 (1989).