

## ナノバイオ技術を用いた新規培養システムの開発

谷口 彰良,\* 和田 健一, 大野 まき

## Development of Novel Culture System Using Nano-biotechnology

Akiyoshi TANIGUCHI,\* Ken-ichi WADA, and Maki OHNO

Advanced Medical Materials Group, Biomaterials center, National Institute  
for Materials Science, 1-1 Namiki, Tsukuba, Ibaraki 305-0044, Japan

(Received October 1, 2009)

We have developed two cell culture systems for use in pharmaceutical research using nano-biotechnology. First, we developed a double layered co-culture system using cell sheet technology, and showed that in a layered co-culture system with HepG2 and bovine endothelial cells, the expression levels of various cytochrome P450 (CYP) genes were significantly increased compared to monolayer cultured HepG2 cells. In the layered HepG2 co-culture, expression of the CYP2C and CYP3A family genes was induced by phenobarbital treatment. We also detected CYP3A4 enzyme induction using this co-culture system. Next, we developed sensor cells. Living cells maintain homeostasis by responding quickly and with great sensitivity to changes in the external environment. Consequently, sensors using cells as active elements are thought to be able to perform analyses faster and with more sensitivity than previous methods. We have modified mammalian cells using genetic engineering techniques to develop next-generation cell sensors that can visually represent specific reactions. We successfully produced devices using sensor cells that can process a variety of specimens using Micro-Electro-Mechanical System (MEMS), Nano-Electro-Mechanical System (NEMS), and other nano/micro processing technologies. These systems may serve as a useful model for *in vitro* pharmacological studies on the coordinated regulation of metabolism and cytotoxicity. In this review, we introduce our research and describe recent trends in this field.

**Key words**—hepatocyte; cytochrome p450(CYP); co-culture; gene expression; Micro-Electro-Mechanical System (MEMS); cytotoxicity

## 1. はじめに

近年、動物実験は動物愛護の観点から極力減らすことが望まれている。また、一方で多くの薬物に対する作用・副作用には種差が報告され、ヒトにおける薬物代謝や毒性を動物実験の結果から予測することは難しい。そこで、ヒト培養細胞を用いた *in vitro* の医薬品の代謝や毒性などを調べることができる実験系が求められる。しかし、細胞は通常の2次元培養では機能が著しく低下し、*in vivo* を反映させることは難しい。特に、肝細胞は培養数日で機能が著しくて低下してしまう。肝臓などの組織は異なる細胞種が3次的にコミュニケーションを取

りつつ、臓器を形成している。この相互作用が肝臓の機能に重要であると考えられている。通常の細胞培養は純化された細胞を2次的に培養するもので、*in vivo* とは全く異なった環境になっている。特に、細胞株の場合、このような培養ではほとんど *in vivo* を反映することは期待できない。

一方で、近年のナノテクノロジーとバイオテクノロジーの発展はめざましいものがある。そこで、この新技術を利用して新しい細胞培養技術の開発が可能になってきている。例えば、ナノテクノロジーを利用することで、細胞の重層化が可能になり、異なる種類の細胞を3次的に共培養することができるようになってきている。この培養系では、細胞-細胞間相互作用が *in vivo* に近い状態になっている。したがって、*in vivo* を反映する培養系になることが期待できる。また、ナノ加工技術を利用することで、細胞培養をチップ化することが可能になっ

独立行政法人物質・材料研究機構生体材料センター先端医療材料グループ (〒305-0044 つくば市並木 1-1)

\*e-mail: taniguchi.akiyoshi@nims.go.jp

本総説は、日本薬学会第129年会シンポジウム S24 で発表したものを中心に記述したものである。

ている。ナノ加工技術を利用することにより、いわゆるハイスループット化が可能になり、医薬品のスクリーニングに適した培養系を供給することができる。また、バイオテクノロジーを用いることで細胞に機能を付加することにより新しい分析手法が可能になってきている。遺伝子のプロモーターと蛍光・発光タンパク質を導入して、特定のシグナルだけを可視化することにより医薬品の細胞毒性などを検出することも可能になってきている。

そこで、筆者らはナノバイオテクノロジーを利用して2つの培養系を開発している。1つは肝・内皮重層化培養である。培養肝細胞は医薬品の代謝試験などに用いられているが、その機能は培養後急速に消失していく。また、細胞株は機能が著しくて低下している。これは、異種間の細胞-細胞相互作用が失われているためと考えられる。肝実質細胞は内皮細胞を介して物質の取込みや代謝を行っている。そこで、このような生体内の細胞環境を *in vitro* で再現すれば細胞の機能が維持できると考えた。われわれは温度感受性培養皿上に血管内皮細胞を培養し、肝細胞株上に重層化することで肝細胞の機能を上昇させることに成功している。特に、CYP 遺伝子群の発現が著しく上昇しており薬物による誘導も確認できる。もう1つは細胞をセンサ化（センサ細胞）し、細胞毒性を高感度に測定するシステムである。熱ショックタンパク質 70B' (HSP70B') のプロモーターとその下流にレポーター遺伝子を組み込んだプラスミドを導入しセンサ細胞を作成した。HSP70B' はタンパク変性など様々な細胞毒性に応答することが知られている。この細胞は塩化カドミウムの毒性を高感度に検出することができた。さらに、ナノ加工技術を用いてマイクロ流路を作成し、この中で細胞毒性を検出することに成功している。マイクロ流路内は表面張力が優位に働くため乱流が起らず層流が形成される。この層流を利用することで多検体同時測定が可能である。また、検体量も微量ですむという利点がある。本誌上シンポジウムではこれらの培養システムを紹介し、創薬支援への応用について考察したい。

## 2. 生体を模倣した肝・内皮重層化培養法による薬物代謝試験

多くの薬物に対する代謝反応には種差が報告され、ヒトにおける代謝を動物実験の結果から予測す

ることは難しい。このため、ヒト肝組織を薬物代謝実験に用い、ヒトの *in vivo* 代謝を予測する試みが重視されている。ヒト初代培養肝細胞は、薬剤代謝に関与する遺伝子の発現が高く、<sup>1,2)</sup> cytochrome P450 (CYP) など薬物代謝酵素の機能や薬剤の CYP 誘導能<sup>3,4)</sup> を解析するための有用な *in vitro* 評価系である。<sup>5-7)</sup> しかし、ヒト初代培養肝細胞は倫理上も含めた種々の制約から入手が困難である。また、肝機能や増殖能力は細胞分離後急速に減少し、特に、薬物代謝酵素の活性低下は顕著である。<sup>8)</sup> このため、ヒト肝細胞としての機能をより長期間保持した、安定供給可能な培養系の確立が必要とされている。

そこで、われわれはヒト肝細胞の特徴を保持した細胞株として汎用されている HepG2 を用いて新たな培養系を作製することにした。HepG2 は増殖能が高く安定供給が可能である。しかし、従来の単独培養下では初代培養肝細胞に比べて、アルブミンや CYP を始めとする薬物代謝関連遺伝子の発現が極めて低い。<sup>9,10)</sup> そこで、肝臓の構造を模倣した培養系を構築することで、HepG2 の肝細胞機能の活性化が期待できると考えた。肝臓は肝細胞（肝実質細胞）と、非実質細胞である内皮細胞などからなる肝小葉を基本単位とし（Fig. 1）、これらの細胞の相互作用によって肝臓の多様な機能が維持されている。肝細胞と内皮細胞は基底膜に似た細胞外マトリックス（ECM）成分を含むディッセ腔を介して、異種細胞のシートを重層したような構造で隣接している。そこで本研究では、肝細胞と内皮細胞の異種細胞を用いて肝小葉の立体構造を模倣した培養系の構築を試みた。

われわれは肝小葉構造を模倣した細胞培養系の構

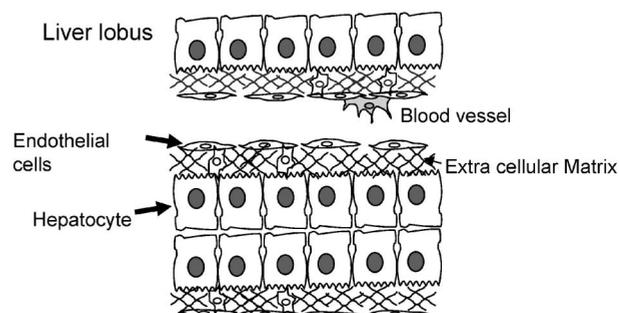


Fig. 1. Structure of Liver Lobus

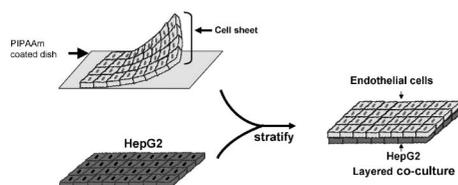


Fig. 2. Schematic Representation of the Construction of the Layered Co-culture System Using Temperature-sensitive Polymer Grafted Surfaces

Endothelial cells are seeded on the PIPAAm-coated dishes and endothelial cell sheets grown at 37°C. The temperature is decreased to 20°C to induce the detachment of endothelial cell sheets; endothelial cell sheets are stratified to HepG2 and assembled into a layered co-culture system.

築を目指し、温度応答性培養皿 (UpCell, セルシート社) を用いて、肝細胞と血管内皮細胞の単層培養組織を重層化した共培養法を作成した (Fig. 2)。東京女子医科大学の岡野教授により開発された温度応答性培養皿は、温度応答性高分子であるポリ *N*-イソプロピルアクリルアミド (PIPAAm) をナノレベルの薄さで電子線で重合させ、培養皿表面に共有結合により固定化したものである。PIPAAm は、32°C に下限臨界溶液温度を持つ。このため、水中では 32°C より低温で疎水性のイソプロピル基周辺の水分子がクラスター構造を形成し、親水性表面となる。一方、32°C より高温ではクラスター構造が壊れ、疎水基同士が凝集した構造となるために脱水状態を示し、疎水性表面となる。通常の細胞培養条件下 (37°C) では、細胞は良好に接着し増殖するが、培養温度を 32°C 以下に保つと表面は親水性に変化し、細胞は自発的に脱離する。細胞を密な状態で培養すると、細胞と ECM、細胞間の接着を保持したまま細胞シートとして回収できる。この技術では、タンパク質分解酵素を用いた従来の細胞回収法とは異なり、細胞膜表面に発現している受容体やイオンチャネルなどの膜タンパク質も分解されない。<sup>11,12)</sup> 細胞シートにはフィブロネクチンなどの細胞接着分子が保持されているため、他の細胞や組織に重層することが可能である。現在では、角膜、歯周組織、食道や心筋など様々な組織の再生や臨床に応用されている。<sup>13,14)</sup>

筆者らはこの技術を用いて、ヒト肝細胞株 HepG2 にウシ血管内皮細胞シートを重層した肝・内皮重層化培養系を作製した。HepG2 はヒト肝細胞の特徴を保持した細胞株として広く用いられているが、初代培養肝細胞に比べて、肝特異的因子であるアルブ

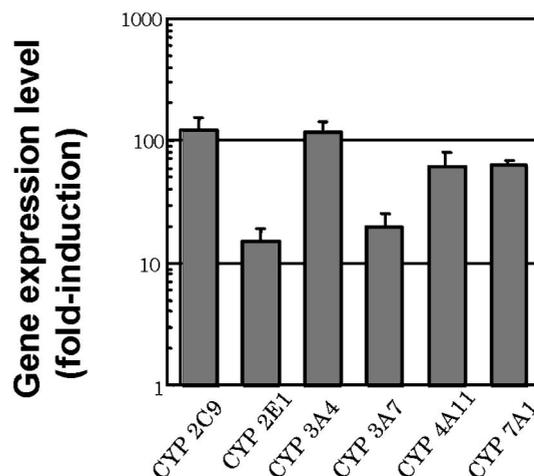


Fig. 3. Comparison of Expression Levels of the Cytochrome P450 Genes between Monolayer Culture and Layered Co-culture at 21 Days after Overlaying a Bovine Pulmonary Artery Endothelial Cell (BPAEC) Sheet onto Hepatic HepG2 Cells

ミンや薬物代謝関連遺伝子の発現が極めて低い。また、ヒト初代培養肝細胞は入手が困難であり、肝機能が数日で著しく低下するという欠点がある。一方で、われわれが構築した HepG2 を用いた肝・内皮重層化培養系ではアルブミンなどの血清タンパク質や薬物代謝関連遺伝子の発現が大きく上昇していた。<sup>15-17)</sup>

われわれはこの実験系を薬物代謝試験に応用することを考え、さらに詳細に薬物代謝酵素遺伝子の発現を調べた。その結果、薬物代謝の第一相反応において中心的役割を担うシトクロム P450 (CYP) は様々なアイソザイムにおいて、HepG2 単独培養に比べ 10 倍以上の発現上昇がみられた (Fig. 3)。中でも CYP4A11 遺伝子はヒト肝組織と同程度の発現を示した。<sup>18)</sup> また、この重層化共培養系では CYP 誘導剤であるフェノバルビタールによって CYP2C9 や CYP3A4 遺伝子の発現誘導が初代培養肝細胞を用いた解析と同程度のレベルでみられた。さらに、CYP3A4 については薬物濃度依存的な酵素活性上昇も検出できた。<sup>18)</sup> このことから、肝・内皮重層化培養により肝細胞の機能が活性化され、薬物代謝酵素の誘導が検出されたと考えられた。

この重層化共培養系におけるアルブミンや CYP 遺伝子の発現変化は比較的緩やかで、重層後 10 日過ぎから上昇をはじめ、20 日後にピークに達した。<sup>15,17)</sup> 重層化共培養の断面図を共焦点レーザー顕

顕微鏡により観察すると、細胞層は重層後に徐々に厚みを増し、重層 20 日後には 2.4 倍、核の厚みは 1.6 倍に肥厚し立方状の形態となっていた。肝細胞の形態と機能には相関があることが知られている。肝細胞と ECM との接着面積が小さく、肝細胞が立体的な形態をとるときほどアルブミン分泌能が高まるということが知られている。<sup>19,20)</sup> このことから、内皮細胞の重層化による ECM 構築の違いが、肝細胞の形態を変化させ肝特異的な機能が活性化されたと予想される。さらに ECM のジオメトリーだけでなく、ECM 成分も肝細胞の機能に大きく影響を与えていることがわかっている。そこでわれわれは、肝・内皮重層化共培養における ECM と細胞接着関連遺伝子の発現変化を、これらの 84 種類の遺伝子について PCR Array を用いて検討した。その結果、HepG2 単独培養と比較して、30 種類以上の遺伝子の発現が変化していることがわかった。<sup>21)</sup> 例えば、ECM に結合する細胞表面受容体の 1 つであるヒト型インテグリン  $\alpha 4$  遺伝子の発現は、重層化培養において重層 20 日後にピークを示し、6.8 倍上昇していた (Fig. 4)。HepG2 表面のインテグリンを介した細胞内情報伝達の変化が、HepG2 の活性化に影響を与えた可能性がある。また、プロテオグリカンの 1 つであるウシ型デコリン遺伝子の発現は、重層後 15 日後にピークを示し、5 倍上昇していた (Fig. 4)。デコリンはコラーゲンなどの ECM タンパク質や増殖因子と結合することによって、細胞内に伝達されるシグナルを調節している。このような ECM の変化による細胞内シグナル伝達経路の活性化が、肝細胞の機能を高める一因になっていると考えている。

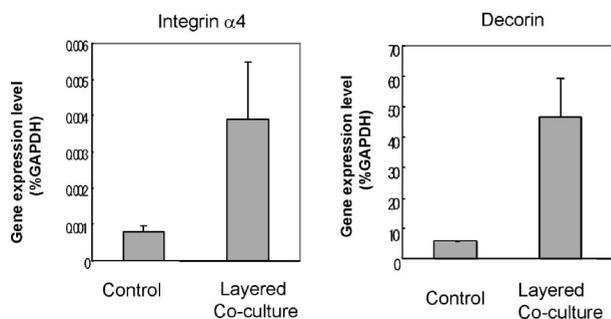


Fig. 4. Comparison of Human Integrin  $\alpha 4$  and Decorin Gene Expression Levels between Layered Co-culture Cells and Monolayer Cultured HepG2 Cells (control) at 14 Days after Overlaying BPAEC Sheet onto HepG2 Cells

以上のように、肝・内皮重層化培養における肝細胞の活性化には ECM のジオメトリーが重要であることが予想された。また、重層化によって発現の変化がみられた ECM の構成成分や細胞接着因子は非常に多いという事実から、この培養系における肝細胞の特異的な機能の発現に、ECM を構成する成分が複雑に影響していることが予想される。今後はより詳細な検討を行い、ECM 成分を人工的に制御することで、細胞機能を活性化できるようになればよいと考えている。

### 3. 細胞毒性を感知するセンサ細胞

細胞は外的刺激や環境の変化に応じて遺伝子の発現を変化することにより恒常性を維持している。この応答は非常に高感度かつ迅速な応答なので、この応答を可視化できれば細胞を毒性などのセンサとして利用することができる (センサ細胞)。<sup>22-27)</sup> 一方で、マイクロ流路は物質や細胞の分離や微量計測に利用されている。マイクロ流路内では表面張力が優位に働くために、乱流が起こり難く、一定の流速があれば層流を作ることが可能である。われわれはこの点に注目し、センサ細胞とマイクロ流路を用いて、ハイスループットな薬物毒性評価システムの構築を試みた。

センサ細胞は Fig. 5 に示すように作成した。細胞毒性に応答する遺伝子のプロモーターの下流にホタルのルシフェラーゼやクラゲの蛍光タンパク質である GFP を接続し、ヒトを始めとする動物細胞に組み込んだ。このセンサ細胞は細胞毒性に応答し、発光や蛍光で可視化することができる。センサ細胞

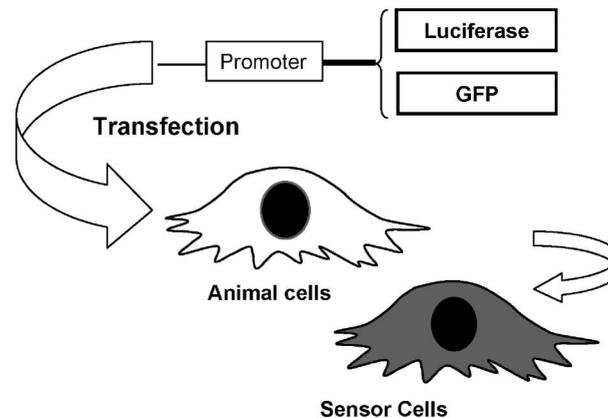


Fig. 5. Construction of Sensor Cells

Sensor cells were constructed by transfected gene which contained promoter and reporter genes such as luciferase or GFP to animal cells.

を作成するために、われわれはまず、熱ショックタンパク質 70B' (HSP70B') のプロモーターに注目した。HSP70B' は温度刺激だけでなく、重金属などの細胞内タンパク質の変性などに対して広くかつ、高感度に応答することが知られている。そこで、われわれは HSP70B' のプロモーターの下流にルシフェラーゼを接続したプラスミドを HepG2 細胞に導入して塩化カドミウムに対する応答を調べた。その結果、既存の ATP 放出を指標とした細胞毒性の測定方法より、5 倍近く検出限界が低いことが明らかになった (Fig. 6).<sup>22)</sup> 次に、HSP70B' の

プロモーターの下流に GFP を挿入したプラスミドを作成した。このプラスミドを NIH3T3 細胞に導入し、薬剤耐性を指標に選択し細胞株を得た。この細胞株は塩化カドミウムに対し、容量依存的に蛍光強度が増加した。2–6  $\mu\text{g}/\text{ml}$  のレンジで検出可能だった。次に、センサ細胞株の塩化カドミウム添加後の蛍光強度の時間変化について検討した。その結果、蛍光強度は 12 時間をピークに増加し、12 時間後から低下した。細胞死の判定には 24 時間必要なので、センサ細胞を用いた毒性評価方法は短時間に判定できるという利点がある。以上の結果から、作成したセンサ細胞株は定量的に細胞毒性を検出できると考えられた。われわれは DNA に作用する細胞毒性を感知するセンサ細胞も BTG2 という遺伝子のプロモーターを用いて作製に成功している。<sup>27)</sup>

トップダウンによるナノ・マイクロ加工技術はナノテクノロジーの発展に伴い、バイオ利用が可能になってきている。このナノ・マイクロ加工技術を用いて細胞毒性検出用のマイクロ流路を作成した。この流路にセンサ細胞株を培養し、細胞毒性を検出するハイスループットなナノバイオデバイスの開発を行った。マイクロ流路内では表面張力が優位に働くために、一定の流速があれば層流を作ることができる。われわれは 3 つの入路があり、1 つの出口を持つマイクロ流路内にセンサ細胞を培養した。その上に濃度の異なる塩化カドミウムの層流を作成し、塩化カドミウムの細胞毒性の検出を行った (Fig. 7)。9  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (図上) では強い蛍光を示し、4  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (中

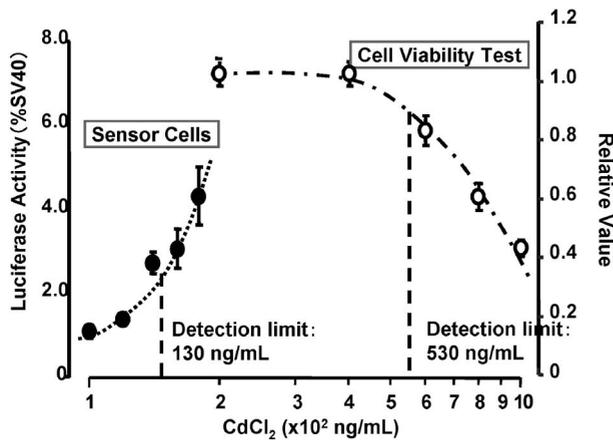


Fig. 6. Standard Curve for CdCl<sub>2</sub> Using Sensor Cells and Cell Viability Test

Detection limit for cadmium chloride with sensor cells was 130 ng/ml. On the other hand, detection limit using cell viability test was 530 ng/ml. These results indicated that the sensor cells have significant advantages for the detection of cytotoxicity in sensitivity, when compared to the cell viability test.

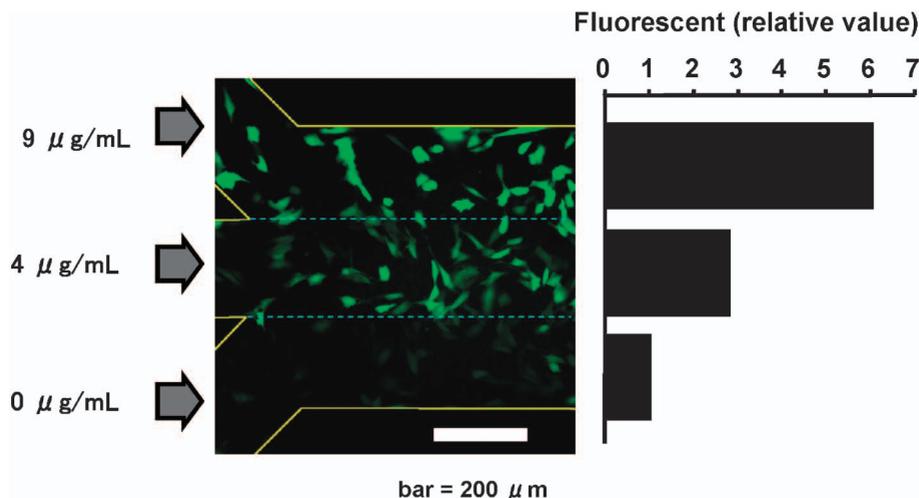


Fig. 7. Cytotoxic Response of the Sensor Cell Line in the 3-inlet Microfluidic Channels  
Fluorescence in the sensor cells increased in a CdCl<sub>2</sub> dose-dependent manner in the microfluidic channels.

央)では弱い蛍光を示した。このように、細胞毒性を検出できるハイスループットなナノバイオデバイスの開発に成功した。<sup>26)</sup> さらに、われわれは自動的に段階的な希釈を行えるマイクロ流路を作製した。そこに、センサ細胞を培養し、塩化カドミウムの細胞毒性を測定した。その結果、塩化カドミウムの濃度に比例したセンサ細胞の蛍光が得られた。<sup>26)</sup> この測定系は非常に少ないサンプル量で測定が可能であり、流路を増やすことにより、同一条件下で多検体の測定が可能になる。いわゆる、ハイスループット分析が可能である。また、センサ細胞の種類を増やすことにより、細胞毒性の原因も簡単にわかるようになるであろう。すなわち、DNAに対する毒性に応答するセンサ細胞 (BTG2 を用いたセンサ細胞) と HSP70B' を用いたセンサ細胞を用いれば、タンパク質の変性に伴う毒性なのか、DNA に対する毒性なのかも判別が可能になる。この測定系は医薬品の毒性スクリーニングに利用できると考えている。

#### 4. おわりに

以上のように、われわれはナノ・バイオテクノロジーを用いて肝・内皮重層化培養とセンサ細胞を用いたハイスループットな細胞毒性の評価系を開発した。肝・内皮重層化培養では、HepG2 というがん細胞株を用いても十分薬物代謝試験を行えることを示すことができた。また、センサ細胞を用いた細胞毒性の検出は高感度で、多検体同時測定が可能な方法である。今後はこれらの培養系を動物実験や従来の細胞実験にとって代わって、創薬支援技術として用いられるようにさらに改良を加えていきたいと考えている。

**謝辞** 本研究は東京女子医科大学岡野光夫、大和雅之、小林純、糸賀各先生方との共同研究で遂行されました。また、多くのご助言を頂いた明治薬科大学の本島清人先生に感謝いたします。

#### REFERENCES

- 1) Baranczewski P., Stanczak A., Sundberg K., Svensson R., Wallin A., Jansson J., Garberg P., Postlind H., *Pharmacol. Rep.*, **58**, 453–472 (2006).
- 2) Raucy J. L., *Drug Metab. Dispos.*, **31**, 533–539 (2003).

- 3) LeCluyse E. L., *Eur. J. Pharm. Sci.*, **13**, 343–368 (2001).
- 4) Worboys P. D., Carlile D. J., *Xenobiotica*, **31**, 539–556 (2001).
- 5) Jigorel E., Le Vee M., Boursier-Neyret C., Bertrand M., Fardel O., *Drug Metab. Dispos.*, **33**, 1418–1422 (2005).
- 6) Payen L., Courtois A., Champion J. P., Guillouzo A., Fardel O., *Biochem. Pharmacol.*, **60**, 1967–1975 (2000).
- 7) Payen L., Sparfel L., Courtois A., Vernhet L., Guillouzo A., Fardel O., *Cell Biol. Toxicol.*, **18**, 221–233 (2002).
- 8) Binda D., Lasserre-Bigot D., Bonet A., Thomassin M., Come M. P., Guinchard C., Bars R., Jacqueson A., Richert L., *Toxicol. in Vitro*, **17**, 59–67 (2003).
- 9) Rodriguez-Antona C., Donato M. T., Boobis A., Edwards R. J., Watts P. S., Castell J. V., Gomez-Lechon M. J., *Xenobiotica*, **32**, 505–520 (2002).
- 10) Wilkening S., Stahl F., Bader A., *Drug Metab. Dispos.*, **31**, 1035–1042 (2003).
- 11) Okano T., Yamada N., Sakai H., Sakurai Y., *J. Biomed. Mater. Res.*, **27**, 1243–1251 (1993).
- 12) Okano T., Yamada N., Sakai H., Sakurai Y., *Biomaterials*, **16**, 297–230 (1995).
- 13) Nishida K., Yamato M., Hayashida Y., Watanabe K., Yamamoto K., Adachi E., Nagai S., Kikuchi A., Maeda N., Watanabe H., Okano T., Tano Y., *N. Engl. J. Med.*, **351**, 1187–1196 (2004).
- 14) Shimizu T., Yamato M., Isoi Y., Akutsu T., Setomaru T., Abe K., Kikuchi A., Umezu M., Okano T., *Circ. Res.*, **90**, e40–e48 (2002).
- 15) Kurosawa Y., Taniguchi A., Okano T., *Tissue Eng.*, **11**, 1650–1657 (2005).
- 16) Takayama G., Taniguchi A., Okano T., *Tissue Eng.*, **13**, 159–166 (2007).
- 17) Ohno M., Motojima K., Okano T., Taniguchi A., *Tissue Eng.*, **14**, 1861–1869 (2008).
- 18) Ohno M., Motojima K., Okano T., Taniguchi A., *Biol. Pharm. Bull.*, **32**, 813–817 (2009).
- 19) Wang N., Butler J., Ingber D., *Science*, **260**, 1124–1127 (1993).
- 20) Mooney D., Langer R., Ingber D., *J. Cell Sci.*, **108**, 2311–2320 (1995).
- 21) Ohno M., Motojima K., Okano T.,

- Taniguchi, A., *J. Biochem.*, **145**, 591–597 (2009).
- 22) Wada K-I., Taniguchi A., Xu L., Okano T., *Biotechnol. Bioeng.*, **92**, 410–415 (2005).
- 23) Okuda-Shimazaki J., Wada K-I., Taniguchi A., *Open Biotechnol. J.*, **1**, 31–33 (2007).
- 24) Wada K-I., Taniguchi A., Okano T., *Biotechnol. Bioeng.*, **97**, 871–876 (2007).
- 25) Wada K-I., Okuda-Shimazaki J., Taniguchi A., *Open Biotechnol. J.*, **1**, 21–25 (2007).
- 26) Wada K-I., Taniguchi A., Kobayashi J., Yamato M., Okano T., *Biotechnol. Bioeng.*, **99**, 1513–1517 (2008).
- 27) Wada K-I., Hamaguchi Y., Furukawa K., Taniguchi A., *Biotechnol. Bioeng.*, **102**, 1460–1465 (2009).