

## C302

## 三次元培養を利用した肝がん細胞の高い薬物排出活性の発現とその応用に関する研究

(崇大院工) (学) ○押方 歩、(正) 松下 琢、(正) 上岡龍一\*

## 1. 緒言

がん細胞は、薬物排出活性などが高まることで、薬剤耐性を獲得していることが知られている<sup>1)</sup>。この薬剤耐性の獲得には、三次元組織形成が関与していることが指摘されているものの<sup>2)</sup>、詳細な検討はなされていない。そこで本研究では、これまで正常肝細胞を対象に研究されてきた三次元培養法<sup>3)</sup>を肝がん細胞に適用し、肝がん細胞の三次元(spheroid)培養法を確立するとともに、肝がん細胞の薬剤耐性の原因の一つである細胞の高い薬物排出活性を、生体外で発現させることを目的とした。モデル薬物として、実際に臨床で使用されている制がん剤であるドキシソルピシン(DOX)を用い、従来の monolayer、spheroid 培養における薬物排出活性の違いを定量的に検討した。また、薬物排出タンパク質である MDR1 の western blotting を行い、spheroid 培養と monolayer 培養における MDR1 の発現量の違いを比較検討した。

## 2. 実験方法

ヒト肝がん細胞(HepG2)を細胞培養ディッシュに播種し monolayer を形成させた。poly-L-glutamic acid 被覆したディッシュに細胞を播種し、96 時間培養して spheroid を形成させた。細胞外への薬物排出活性の測定では、DOX 含有培地で 1 時間インキュベートすることで細胞に DOX を取り込ませた後、測定用培地に交換し、培地中に排出された DOX 量を測定し、単位細胞数当たりの排出活性を算出した。MDR1 の western blotting は、monolayer、spheroid のサンプルを SDS-PAGE で分離し、転写、ブロッキング、抗体反応を行った後、発光基質を用いて検出を行った。

## 3. 結果と考察

制がん剤として利用されている DOX を用いた排出活性測定実験の結果、monolayer 培養に比べ、spheroid 培養では高い薬物排出活性が示された(Fig.1)。このことから、がん細胞の spheroid 培養によって、*in vivo* のがん細胞の高い薬物排出活性が *in vitro* で発現できる可能性が示された。また、MDR1 の western blotting の結果、spheroid で検出されたバンドは、monolayer に比べ、より濃いものであり、再現性も確認された(Fig.2)。これより、spheroid の方が monolayer よりも、MDR1 の発現量が多く、そのために排出活性が高くなったことが示唆された。また、spheroid で検出されたバンドは、肝がん組織サンプルの濃さとほぼ同等であったため、monolayer 培養に比べ、spheroid 培養のほうが、より生体内の環境に近いことが示唆された。さらに、MDR1 で排出されることが知られる<sup>1)</sup>、DOX の細胞増殖抑制試験(IC<sub>50</sub>)においても、monolayer 培養と spheroid 培養では差があり、spheroid 培養の高い薬物排出活性を反映して、spheroid 培養で高い IC<sub>50</sub> 値が得られた(Fig.3)。以上の結果から、spheroid 培養の方が、生体内のがん組織に近い

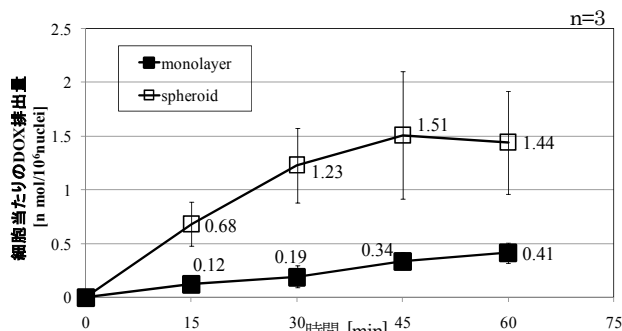


Fig.1 HepG2 細胞の monolayer、spheroid 培養における DOX 排出量の経時変化

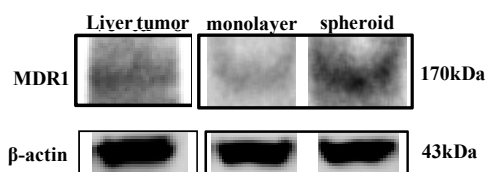


Fig.2 western blotting 法による、生体肝がん組織と HepG2 細胞の monolayer、spheroid 培養における MDR1 タンパク質の発現量の比較

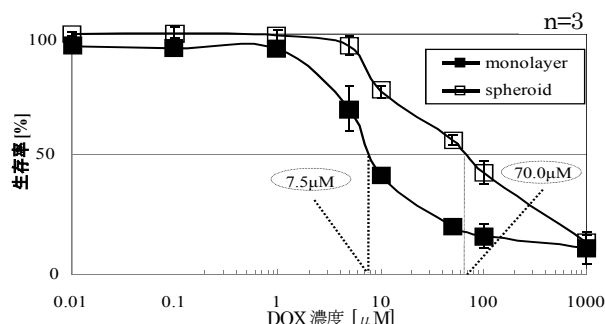


Fig.3 monolayer 培養、spheroid 培養における DOX の 50%増殖抑制試験

薬物排出活性を有している可能性があり、IC<sub>50</sub> 値も spheroid 培養の方が生体内での値をより反映している可能性があることが示された。現在、制がん剤の細胞レベルにおけるスクリーニングでは、monolayer 培養が行われているが、monolayer 培養では、低い薬物排出活性のために、細胞内の薬物濃度が高くなり、そのため生体内に比べ低い IC<sub>50</sub> 値を示す可能性がある。今後は、細胞レベルと *in vivo* の動物レベルの実験の間に spheroid 培養を取り入れることで、より *in vivo* に接近した IC<sub>50</sub> 値の結果が得られるものと期待される。

## 4. 引用文献

- 1) T. Tsuruo, M. Naito, A. Tomida, N. Fujita, T. Mashima, H. Sakamoto and N. Haga, *Cancer Sci.*, **94**, 15-21(2003).
- 2) M. Wartenberg, C. Frey, H. Dierschagen, J. Ritgen, J. Heascheler, H. Sauer, *Int. J. Cancer.* **75**, 85-63(1998).
- 3) T. Matsushita, A. Kiyota, Y. Nishikura, M. Anno, R. Ueoka, *J. Oral Tissue Eng.*, **4**, 25-31(2006).

\*TEL: 096-326-3952 FAX: 096-326-0552

e-mail: ueoka@life.sojo-u.ac.jp