

## C309

マイクロウェル構造を利用した異種細胞凝集体の構築と  
その極小化限界把握の試み

(東大生研) ○(学)鈴木 宏明\*・木村 啓志・(正)小森 喜久夫・

藤井 輝夫・(正)酒井 康行

## 【緒言】

化学物質等の評価のため、培養細胞を用いたハイスループットな *in vitro* 評価デバイスの開発が期待されている。その際、必要最小限の細胞リソースから、臓器特異的な生理学的妥当性を伴う応答や機能を効率的に取得できることが望ましい。我々はこれまでに、ガラス表面に肝細胞を異なる細胞数で二次的にアレイ化し、その極小化限界を評価してきた。一方で、生体内では複数の細胞種が三次元的に共存し組織としての機能を果たしている。そこで本研究では、ウェル構造内に形成される肝細胞の凝集体及びその異種細胞との共培養に着目し、細胞集団のサイズごとに肝特異機能及び毒性物質に対する応答に関して系統的な評価を行い、極小化限界把握を試みた。

## 【実験】

細胞凝集体を安定的に培養するためのアレイ用基板として、フォトリソグラフィ技術によってポリジメチルシロキサン (PDMS) に直径 63, 200, 630, 2000  $\mu\text{m}$ 、深さ約 20-30  $\mu\text{m}$  のマイクロウェル構造を造形した (図 1)。マイクロウェルの外部には細胞・タンパク非付着性の MPC ポリマーを被覆させ、マイクロウェル内には細胞接着を促すコラーゲンを吸着させた。そこにヒト肝癌由来細胞株 Hep G2 を  $2.0 \times 10^5 \text{ cells cm}^{-2}$  で播種し、約 5 日間培養してサイズの異なる肝細胞凝集体を形成させた。

この肝細胞凝集体に対し、肝特異機能としての Cytochrome P450 1A1/2 (CYP) 活性を Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) 試験によって、細胞 1 個あたりの数値として定量し、細胞凝集体のサイズが肝機能向上に与える影響を系統的に評価した。さらに、毒性物質への応答評価として、CYP によって代謝を受けてより強い毒性を発現する Aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) を細胞凝集体に 48 時間曝露し、各々の凝集体における細胞生存率を Calcein-AM による生細胞染色によって評価した。

## 【結果と考察】

作製した PDMS 基板 (図 1) に Hep G2 を播種したところ、全てのサイズにおいてマイクロウェル内だけに細胞が接着・伸展することが確認できた (図 2)。

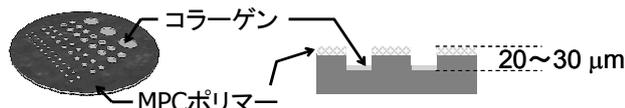
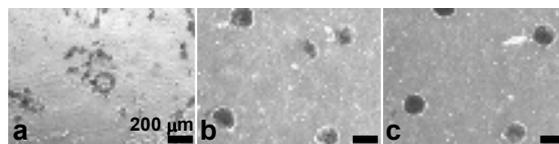


図 1. PDMS による細胞アレイ用基板

Hep G2 はおよそ 3 日目と上方に積層化し、およそ 5 日目を迎えたところで、十分に凝集体を形成した。その後さらに培養を継続しても更に大きく成長することはなかった。また、肝細胞凝集体は 630  $\mu\text{m}$  以下のサイズにおいて全体に渡る凝集体を形成し、附着

図 2. 200  $\mu\text{m}$  における細胞凝集体。(a)Day 1, (b)Day 3, (c)Day 5

面積 2000  $\mu\text{m}^2$  では局所的に密になる部分を形成するものの、全体として大きな凝集体を作るには至らないという、各サイズにおける形態の相違点も観察された。これら観察結果より、およそ 5 日間培養を継続したところが最も細胞凝集体として密になったものと仮定し、この時点で各種の評価を行った。

EROD 試験によって細胞 1 個あたりの CYP 活性を評価したところ、細胞附着面積が 63  $\mu\text{m}^2$  と 200  $\mu\text{m}^2$  以上の肝細胞凝集体との間に明

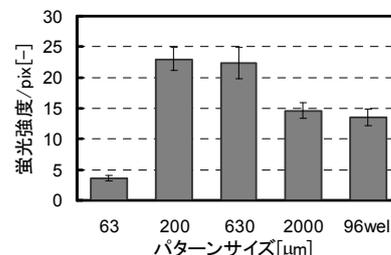
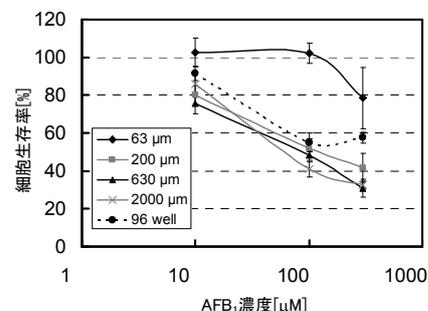


図 3. 細胞凝集体各サイズの CYP 活性

確な活性の閾値を見出した (図 3)。特に、附着面積 2000  $\mu\text{m}^2$  に比べて細胞凝集体をより密に形成した、200, 630  $\mu\text{m}^2$  で活性値が高く、2000  $\mu\text{m}^2$  の活性は 96 well と同等であった。

更に、AFB<sub>1</sub> 曝露による毒性試験では、EROD 試験で得られた CYP 活性の閾値と同様、200  $\mu\text{m}^2$  以上の細胞集団で毒性を発現した。また、CYP 活性値が

図 4. AFB<sub>1</sub> に対する各サイズの用量作用曲線

特に高かった 200  $\mu\text{m}^2$  及び 630  $\mu\text{m}^2$  の肝細胞凝集体では、AFB<sub>1</sub> 濃度が低い領域 (10  $\mu\text{M}$ ) においても、汎用試験系である 96 well より高い毒性を示した (図 4)。以上のことから、肝細胞が集団を形成し、組織としての肝機能を向上させるには、一定数以上の細胞が高密度に三次元凝集体を形成することが重要な要因であり、かつその極小化限界はおよそ 200  $\mu\text{m}^2$  程度であることが示された。

現在我々は更なる展開として、Hep G2 とマウス皮膚由来線維芽細胞株 NIH-3T3 との共培養下における細胞凝集体の評価を行っている。

謝辞: 本研究の一部は、「第2回マンダム動物実験代替法国際研究助成」を受けて行われた。

\*shiroaki@iis.u-tokyo.ac.jp