

2019年 日化協LRI 研究報告会

シリカファイバー三次元培養担体を用いた
ヒト肝臓細胞の機能発現に関する研究

[日本動物実験代替法学会 第3回LRI 賞]

古水 雄志

(崇城大学 生物生命学部 応用生命科学科)



2019.8.30

3D培養による抗がん剤の薬剤耐性について

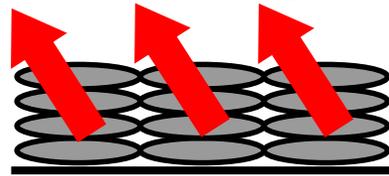
※多剤耐性
(MDR: Multi Drug Resistance)

抗がん剤

薬剤排出小



薬剤排出大



細胞実験
(*in vitro*, 3D)

腫瘍

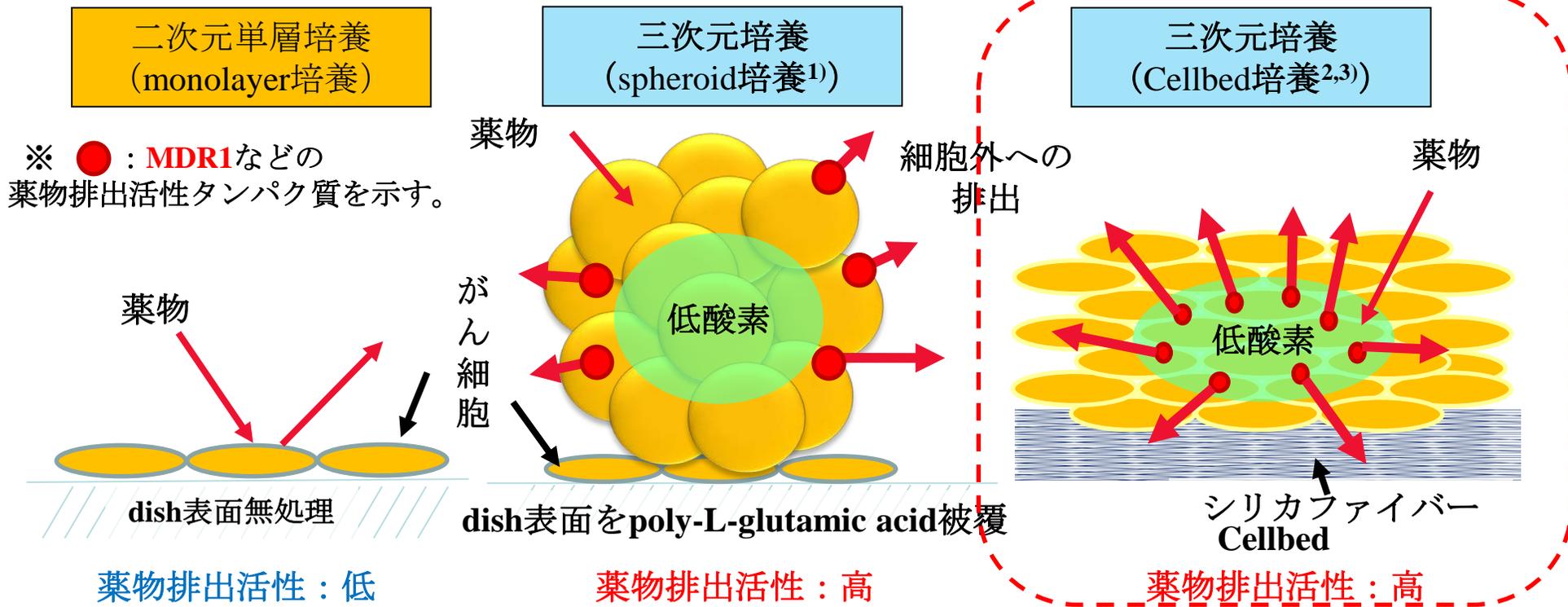


動物実験
(*in vivo*)

ヒト

細胞を三次元培養(3D培養)することで、MDRの機能が高まることで薬剤耐性を示す。これは従来の単層培養(2D培養)では再現が難しいため、生体内を模倣できるような *in vitro*での新規スクリーニング系の開発が望まれる。

がん三次元培養の研究について



三次元組織化培養によるがん細胞の薬物排出活性の発現

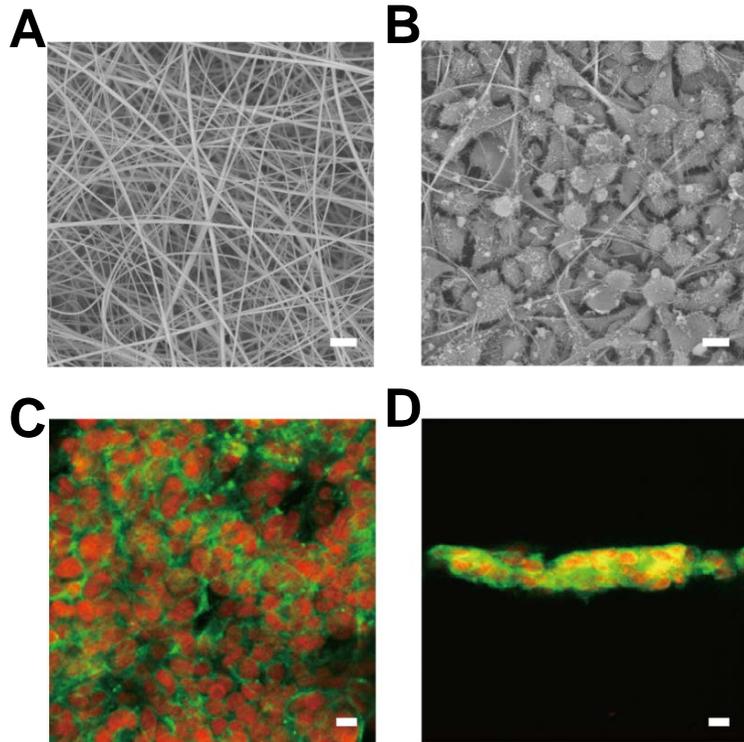
がん細胞は、薬物排出活性などが高まることで、薬剤耐性を獲得していることが確認されている。これまで本研究室では、肝がん細胞(HepG2細胞)の**MDR1活性**を、三次元培養で発現させることに成功している。

1) A. Oshikata, T. Matsushita, R. Ueoka, *J. Biosci. Bioeng.*, **111**, 590-593 (2011).

2) T. Mizutami, Y. Ohta, M. Nakamura, Y. Komizu, T. Iwasa, K. Sasaki, R. Watanabe, M. Kawabe, T. Matsushita, *Adv. Biochem. Biotechnol.*, **112** (2017).

3) K. Inamura, K. Emoto, H. Ichihara, K. Sasaki, T. Iwasa, R. Kojima, M. Kawabe, Y. Komizu, Y. Matsumoto, T. Matsushita, *J. Carcino. Mutagen.*, **9** (2018).

Cellbed[®]を用いたHepG2細胞の3D培養



A, 3D培養基材(シリカファイバー)の SEM,
 B, 3D培養したHepG2細胞のSEM観察画像,
 C, 3D培養したHepG2細胞の蛍光画像 (表面),
 D, Cの断面 (3~4層の細胞層形成)

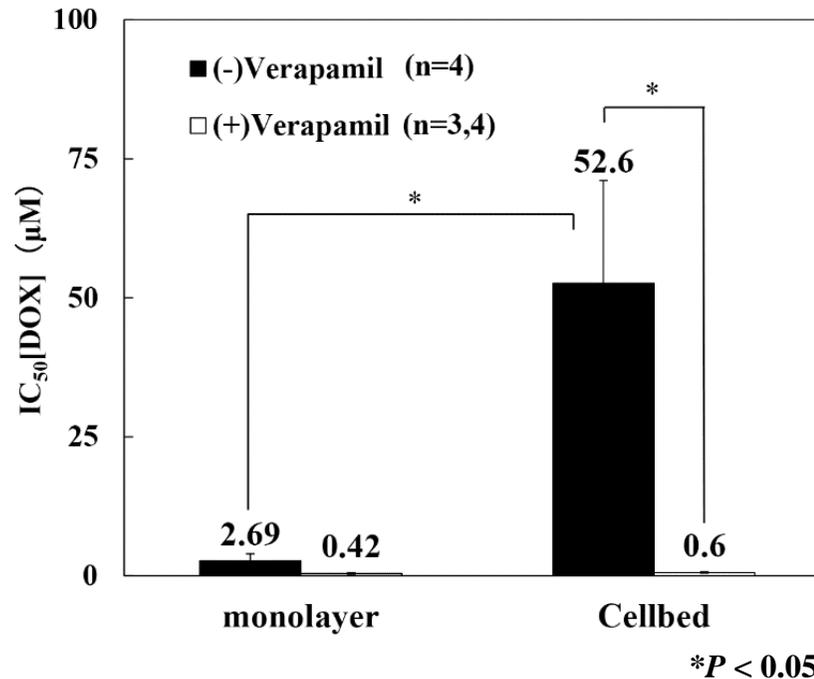
赤:核、緑:アクチン

Scale bars: 10 μ m

Mizutami et al., *Adv Biochem Biotechnol*, 2017, 112

三次元培養担体Cellbed[®]を用いて肝臓がん細胞(HepG2細胞)を7日間培養した際に共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。細胞は、シリカファイバーの内部または上部へ積層して均一な3D培養を可能としていた。

In vitro(Cellbed® 3D培養)における薬剤耐性と薬剤耐性克服現象



モデル薬物

- ・抗がん剤
Doxorubicin (DOX)
- ・薬剤耐性克服薬(MDR1
阻害剤)
Verapamil (VRP)
- ・曝露時間
48時間

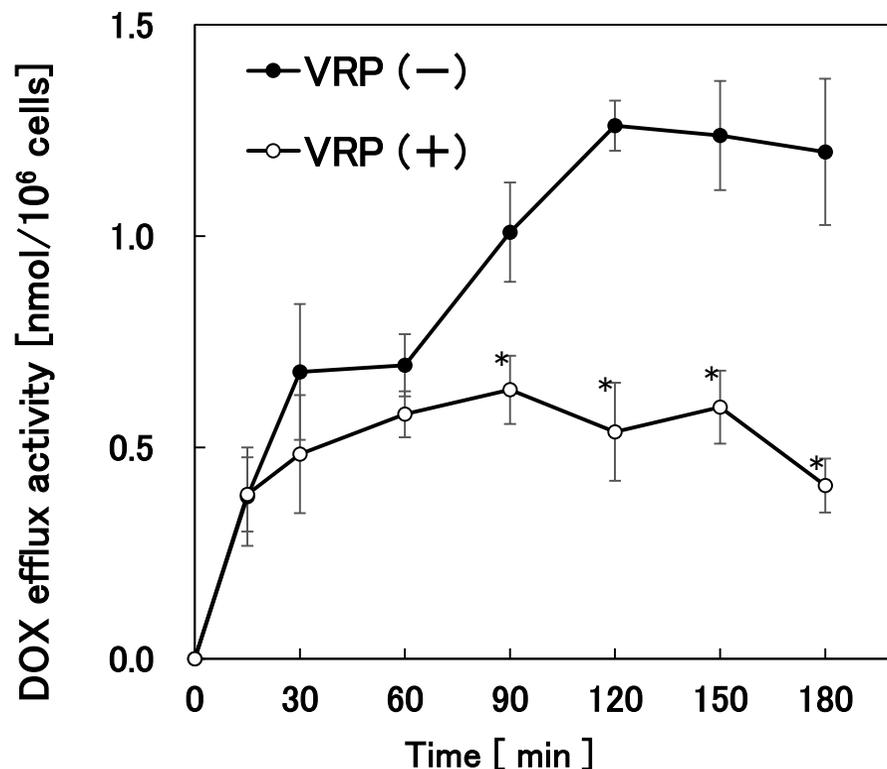
HepG2細胞の2D培養及び
3D培養におけるIC₅₀値の
比較

Mizutami et al., *Adv Biochem Biotechnol*, 2017, 112

2D培養(単層培養)と3D培養(Cellbed®培養)において、DOXに対するIC₅₀値は3Dの方が高く、薬剤耐性を示した。一方で、VRPを併用することでIC₅₀は顕著に低下し、明らかな薬剤耐性克服現象が観測された。

In vitroにおける薬剤耐性と薬剤耐性克服現象

Cellbed® 3D培養



* $p < 0.05$

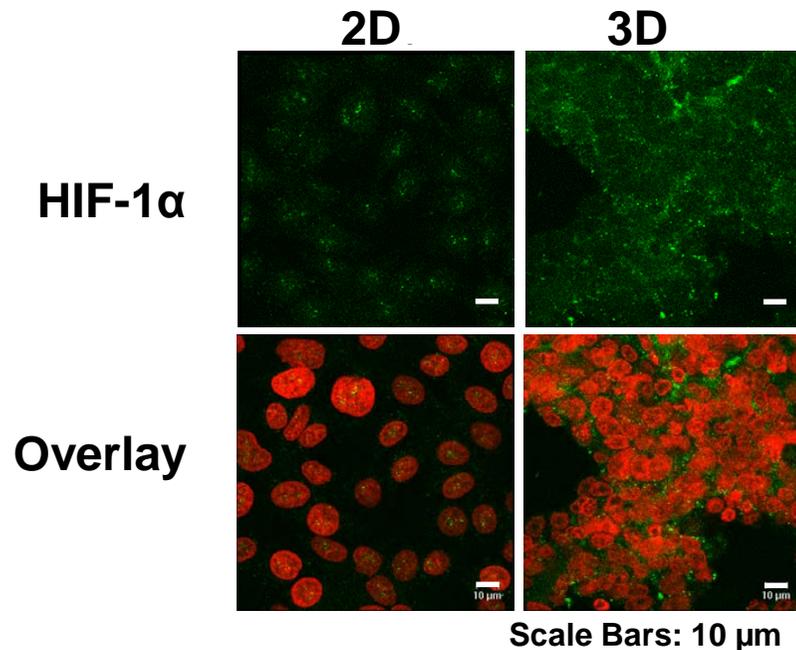
モデル薬物

- ・抗がん剤
Doxorubicin (DOX)
- ・薬剤耐性克服薬
Verapamil (VRP)
- ・細胞へのDOX取り込み時間
1時間

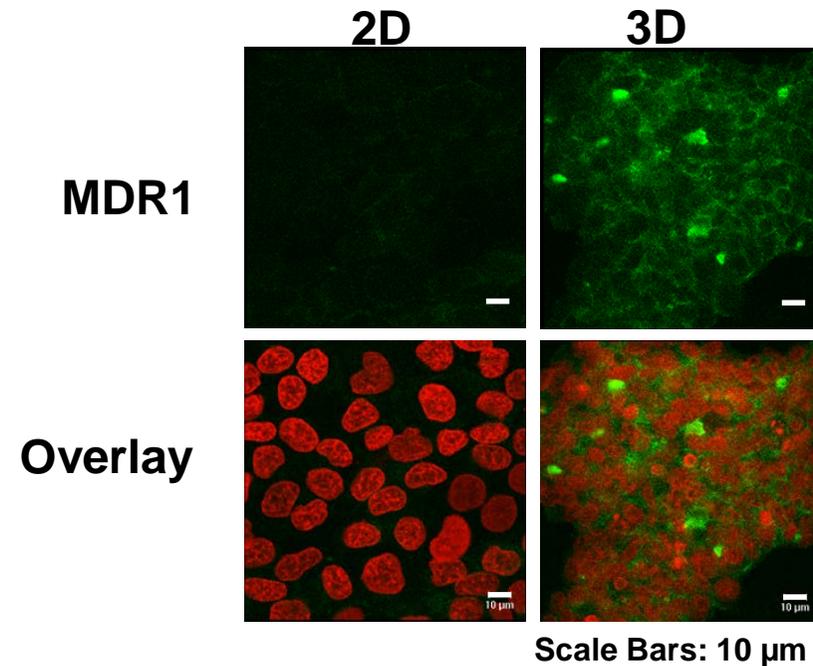
3D培養によるDOXの排出活性

Inamura et al., J Carcinog Mutagen 2018, 9:2

3D培養(Cellbed®培養)において細胞に取り込まれたDOXは、VRP (-)ではMDR1によって速やかに排出されるが、VRP (+)では排出が阻害された。そのため、低濃度のDOXで増殖が抑制されたものと思われる。

2Dおよび3D培養によるHIF-1 α とMDR1の発現

HepG2細胞の2D培養および
3D培養におけるHIF-1 α の免疫染色



HepG2細胞の2D培養および
3D培養におけるMDR1の免疫染色

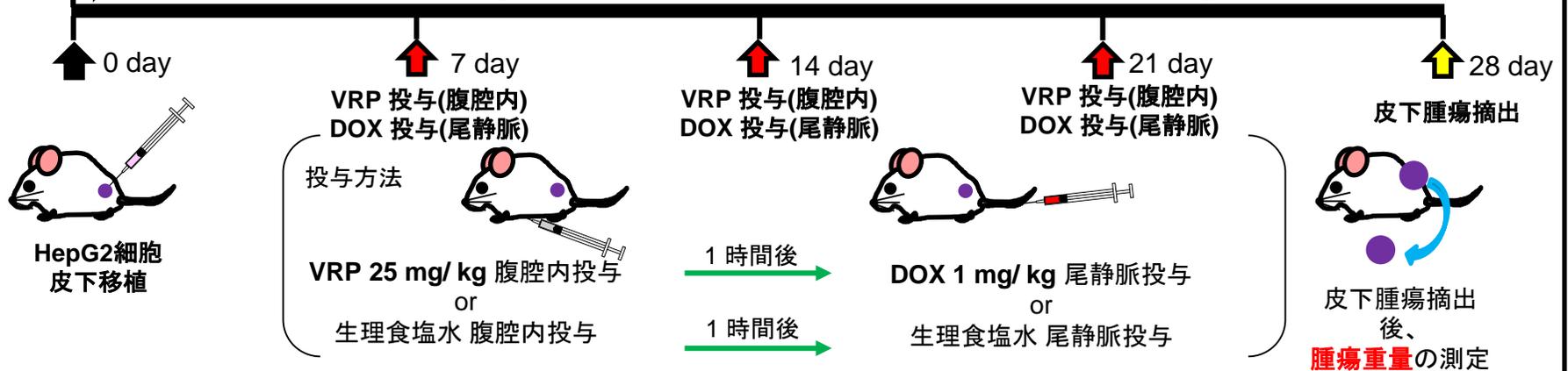
2D培養(単層培養)では、HIF-1 α およびMDR1の発現が低い一方で、3D培養(Cellbed[®]培養)することにより、HIF-1 α およびMDR1の発現が高まることが示された。

担がんモデルマウスによる薬剤耐性現象

*In vitro*実験と同じ細胞、同じ薬剤を使って、*in vivo*実験でも同じ薬剤耐性現象が起こるかを検証

Cell line-derived xenograft (CDX)モデル

⇒ **体重測定・腫瘍サイズ測定 (腫瘍体積 = 腫瘍長径 × 腫瘍短径 × 腫瘍短径 × 1/2), 1日ごとに測定**



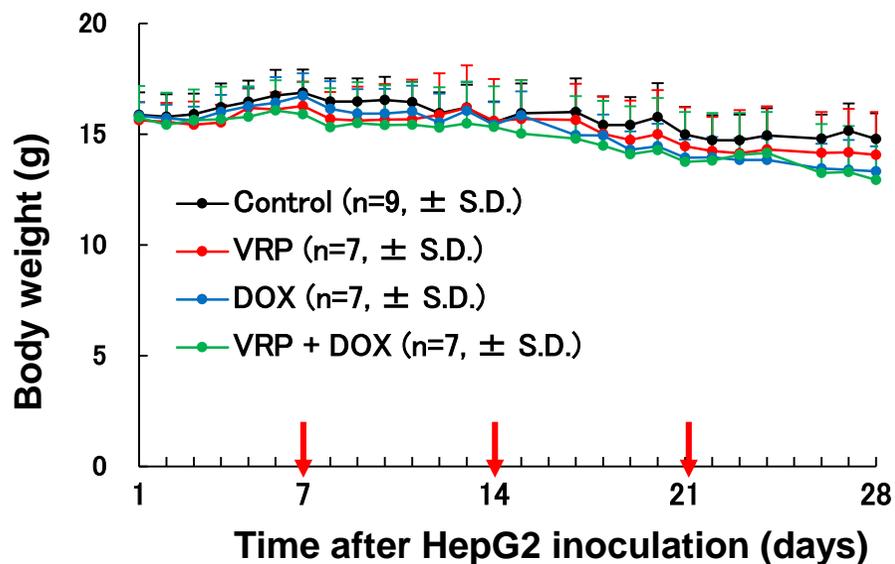
使用動物
高度免疫不全マウス(NOD/ Scid/ Jak3-KO), ♀, 5週齢

移植細胞
HepG2細胞 (肝がん細胞)

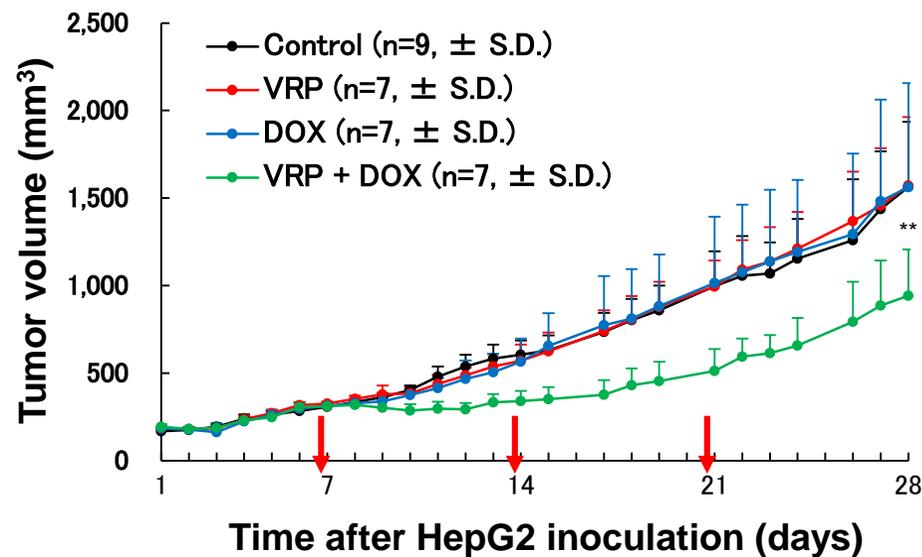
皮下移植
細胞懸濁液: マトリゲル = 1:9
5 × 10⁶ cells/ body (100 μL)で皮下移植

- ・薬効の評価: 腫瘍体積の算出
腫瘍重量
- ・薬毒性評価: 体重測定

In vivo((CDX)モデル)における体重変化と腫瘍体積の変化



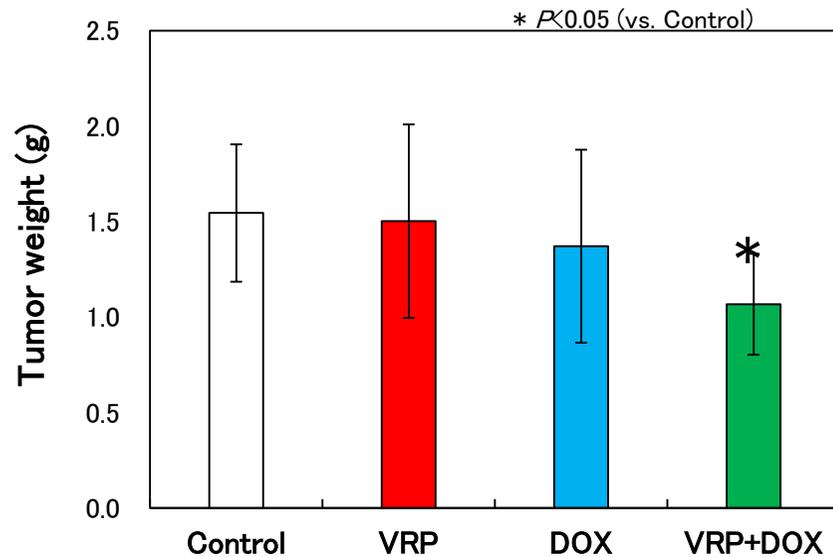
HepG2細胞を皮下移植した後の体重変化



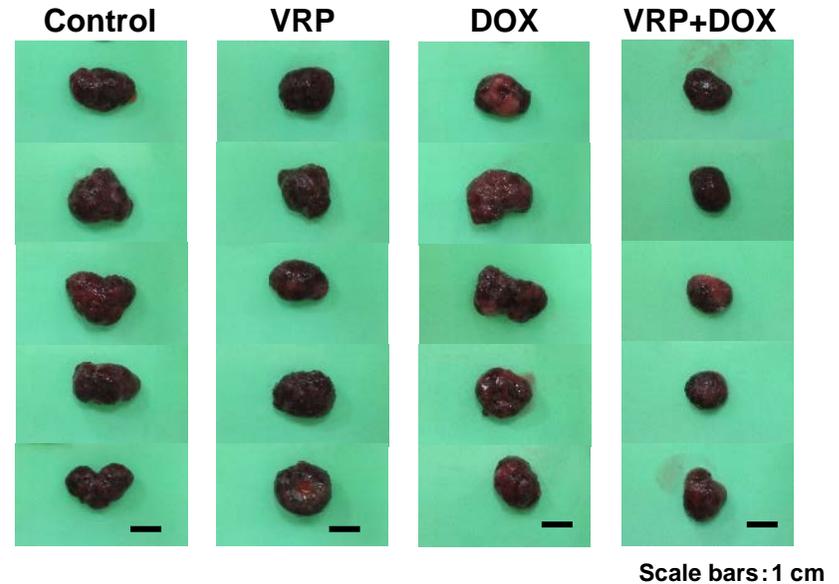
HepG2細胞を皮下移植した後の腫瘍体積変化

薬剤投与により毒性が出ない濃度で(体重減少が起こらない濃度範囲)、DOX単独では薬剤耐性を示した一方で、VRP+DOX併用により薬剤耐性克服現象が観測された。

(CDX)モデルから摘出した腫瘍の重量と大きさの比較



HepG2細胞を皮下移植して
28日目に摘出した腫瘍の重量

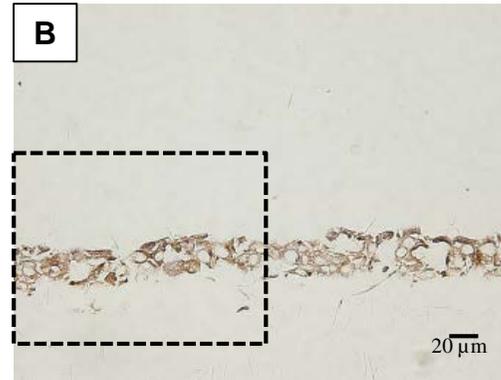
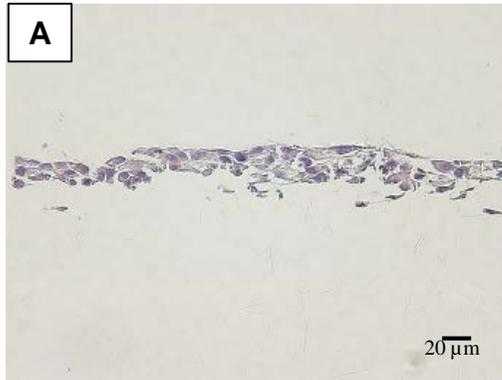


HepG2細胞を皮下移植して
28日目に摘出した腫瘍の写真

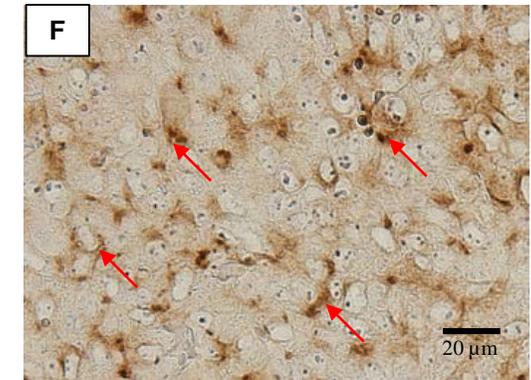
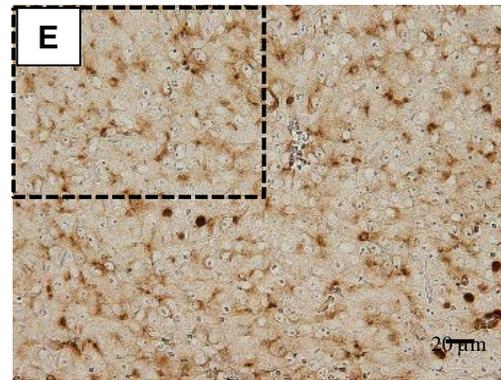
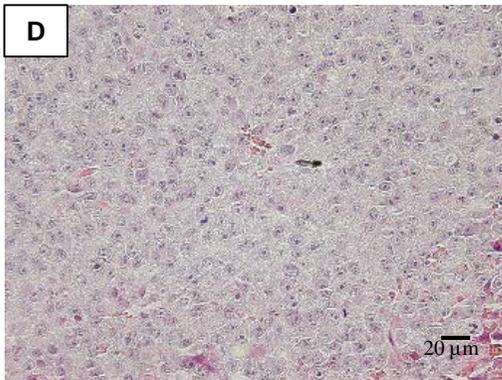
DOX単剤では腫瘍重量はControl(未治療群)と差が無かったが、VRP+DOX併用群ではControlと比べて有意に重量が減少したことから、薬剤耐性克服現象が認められた。

In vitro と *In vivo* (CDX)モデルにおけるMDR1発現

In vitro
(Cellbed®
3D培養)



In vivo
(腫瘍)



In vitro (三次元培養担体断面)と*in vivo* (腫瘍断面)のMDR1発現の比較
A. *In vitro*のHE染色 B. *In vitro*のMDR1の免疫染色 C. Bの拡大
D. *In vivo*のHE染色 E. *In vivo*のMDR1の免疫染色 F. Eの拡大

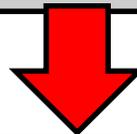
まとめ

in vitro 細胞実験

- 肝がん細胞(HepG2細胞)の monolayer(2D)培養では薬剤排出活性が低く、薬剤耐性克服現象が明確に観測できない。
- Cellbed®で3D培養することにより、DOXに対するIC₅₀値が大きくなり、DOXの細胞外排出量が増加するが、VRPを用いた薬剤耐性克服現象が明確に観測された。
- 培養基材切片より、MDR1が細胞周囲に発現していた。

in vivo 動物実験 (CDXモデル)

- DOX単独投与群では、腫瘍体積変化・腫瘍重量ともに未治療群(Control)と比較して薬効が見られず、高い薬剤耐性を示したと考えられる。
- VRP+DOX併用群では、腫瘍体積変化・腫瘍重量ともに未治療群(Control)と比較して腫瘍の縮小効果が見られ、薬剤耐性克服現象が観測された。
- 腫瘍切片より、MDR1が細胞周囲に発現していた。



【結論】

Cellbed®3D培養による肝がん細胞の*in vitro*評価系は、*in vivo*での薬剤耐性現象を再現でき、薬剤耐性克服薬スクリーニングに有望である。