

1. 研究課題名：ラット初代培養肝細胞における、細胞凝集体形成の基礎的検討

2. 研究機関：科学技術振興事業団・長崎研究室

3. 研究者：横山兼久

4. 研究協力者：松田尚樹（科学技術振興事業団・長崎研究室）

竹下哲史（科学技術振興事業団・長崎研究室）

森田直子（科学技術振興事業団・長崎研究室）

渡邊正己（長崎大学薬学部放射線生命科学教室）

5. 研究期間：平成7年～平成9年

## 6. 要約

ラット初代培養肝細胞の、コラーゲンゲル上培養における細胞凝集体の形成と形態の維持および機能の維持における、培養液へのデキサメサゾン、インシュリン、EGF および DMSO の添加の効果について検討を行った。細胞凝集体の形成および維持にはデキサメサゾン、インシュリンおよび DMSO の添加が必要であった。機能の発現については、デキサメサゾンとインシュリンの効果が大きかった。DMSO は、コラーゲンゲル上に形成された細胞凝集体の維持には必須であり、その効果は、細胞凝集体の独立した安定性と細胞外マトリックスとの親和性の低下として確認された。コラーゲンゲル上でのラット初代培養肝細胞の培養では、デキサメサゾン、インシュリンおよび DMSO の培地中への添加により、細胞凝集体が形成され、さらに形態が維持され、細胞機能の発現が維持されると考えられる。

## 7. 目的

近年、培養面へ細胞を接着させた単層培養に代わり、細胞の凝集体を形成させたいいわゆる3次元培養が実際の生体に近い環境下での培養法として取り上げられている。

肝細胞においては、細胞凝集体を形成させることにより、肝細胞としての機能が単層細胞培養に比較して長期間に亘り維持されることが多数報告されている。肝細胞の3次元培養法としては、細胞を培養面から浮遊させ細胞体を形成させるものや、EHS ゲルや架橋度を低下させたコラーゲンゲルを培養面に敷き、その上で肝細胞を培養することによりゲルに接したかたちで細胞塊を形成させる方法等がある。

細胞凝集体の形成において、培養方法や培養床の検討は多々なされているが、培地成分と細胞凝集体の形成についてあまり検討はされておらず、従来の単層培養において検討されてきた培地条件を踏襲したかたちとなっており、培地としてはインシュリン等のホルモン類を添加したものが使用されている。細胞凝集体の形成において、培養面の性質や細胞外マトリックスの性状も重要であるが、培地のに添加されるものも細胞凝集体の形成において無視できないファクターであると思われる。

培地中のホルモン類等の効果は、従来の単層培養においては、調べられているが、細胞凝集体を形成させる際の効果はあまり検討されていない。

ペプシン処理をほどこし、分子間の架橋度を低下させた1型コラーゲンゲル上培養において、EGF、インシュリン、デキサメサゾンおよび DMSO を添加した培地中で培養することにより、コラーゲンゲル上に肝細胞の細胞体を形成させ、長期に亘り、アルブミンの合成能など

の機能を維持できることが報告されている。

この細胞凝集体の形成と機能維持に関する要因として、1) ホルモン等の生物学的生理活性物(デキサメサゾン、インシュリン、EGF)、2) 培地添加DMSO、3) コラーゲンなどの細胞外マトリックスの構造性質が挙げられる。これらの効果についてその効果およびメカニズムを明らかにすることによって、ラット初代培養肝細胞の細胞凝集体の形成および、細胞凝集体形成による細胞機能の発現および維持についてのメカニズムを知る手がかりになると思われる。コラーゲンゲル上でのラット初代培養肝細胞における細胞凝集体形成の基礎的検討として、1) 長期培養における、細胞凝集体の形成と維持へのデキサメタゾン、インシュリン、EGF の効果、さらに DMSO の作用のメカニズムを明らかにするため、2) DMSO とデキサメタゾン、インシュリン、EGF との相関、3) 細胞凝集体の形態形成および維持における DMSO の効果について検討をおこなった。

## 8. 方法、材料

### 【ラット肝実質細胞の採取】

肝実質細胞は、5~6 週齢の雄ウィスターラットから、Seglen らの方法に従い、コラゲナーゼ灌流法により採取した。簡単に記載すれば、門脈からまずカルシウムフリーの前灌流液約 100ml 灌流した後、0.5mg/ml のコラゲナーゼ(和光)を含むコラゲナーゼ液を灌流し、二重のガーゼでろ過したのち低速心(50G/1min × 4)により、肝実質細胞を採取した。細胞生存率は、トリパンブルー排除法により、85%以上のものを用いた。

### 【培地の調製】

培地は、ライホビッツ L-15 培地に 10%FBS、30mg/l プロリン、20mM HEPES、20mM NaHCO<sub>3</sub>、ペニシリン G カリウム 10<sup>5</sup> U/l、ストレプトマイシン 200mg/l を添加したものを基本とし、組み合わせにより、0.1 μM デキサメタゾン(和光)、0.1 μM インシュリン(和光)、10 μg/l EGF(和光)、2%DMSO を添加した。培地への添加物の組み合わせは次の表の通りである。

表1. 培地の組成

| 基礎培地: ライホビッツL-15培地                             |     |        |         |
|--|-----|--------|---------|
| ホルモン類以外の添加: DMSO: 2%, FBS: 10%, L-プロリン: 30mg/l |     |        |         |
| ホルモン類等の添加                                      |     |        |         |
| 培地   | EGF | インシュリン | デキサメサゾン |
| A  | +   | +      | +       |
| B  | +   | -      | +       |
| C  | +   | +      | -       |
| D  | +   | -      | -       |
| E  | -   | +      | +       |
| F  | -   | -      | +       |
| G  | -   | +      | -       |
| H  | -   | -      | -       |

添加濃度: EGF 10 μg/l, インシュリン: 0.1 μM, デキサメサゾン: 0.1 μM

#### 【ペプシン処理 1 型コラーゲンゲル培養床の作製】

ペプシン処理 1 型酸性コラーゲン溶液を中和し、ウエルに分注し、37 インキュベーター中に静置し、コラーゲンをゲル化した。各培養器へのコラーゲン中和液の分注量は、24 穴プレート 0.3ml/well、35mm ディッシュ 1.5ml/dish、60mm ディッシュ 3ml/dish、90mm ディッシュ 7ml/dish である。

#### 【コラーゲンコート培養床の作製】

0.3%牛真皮由来ペプシン処理 1 型コラーゲン酸性溶液を PBS(-)に 10 倍希釈し、コラーゲンコート溶液を調製、このコラーゲンコート溶液を培養器中に培養面が覆われる量を分注し、24 時間放置したのち、コラーゲンコート溶液を除去し、超純水で洗浄し、室温でクリーンベンチ中で風乾した。

#### 【培養】

コラーゲンゲル上およびコラーゲンコート上へは、1 平方センチメートルあたり約  $2 \times 10^4$  個で細胞を播種し、培地交換は 1 ないし 2 日毎におこなった。

#### 【ラット肝実質細胞スフェロイドの形成】

スフェロイド形成用マルチウエルプレート（住友ベークライト社製）に肝実質細胞を播種し、各ウエルに約 500 個のラット肝実質細胞を播種し、単一な小スフェロイドを形成させた。

培地は、L-15 培地を基本培地とし 10%FBS、 $0.1 \mu\text{M}$  デキサメタゾン（和光）、 $0.1 \mu\text{M}$  インシュリン（和光）、 $10 \mu\text{g/l}$  EGF（和光）、 $30\text{mg/l}$  プロリン、 $20\text{mM}$  HEPES、 $20\text{mM}$   $\text{NaHCO}_3$ 、ペニシリン G カリウム  $10^5 \text{U/l}$ 、ストレプトマイシン  $200\text{mg/l}$  を添加したものをを用いた。DMSO の添加は、播種時より行い、DMSO の添加は 2 %とした。

#### 【形態観察】

倒立位相差顕微鏡により行った。

#### 【培養上清中のアルブミン量の測定】

培養上清を回収し、アルブミン量を測定した。アルブミン量は抗ラットアルブミンポリクローナル抗体を用いサンドイッチ法による ELISA により測定した。

#### 【P-450 活性】

$1 \mu\text{g/ml}$  3-メチルコラントレンを添加した培地を加え 24 時間処理し活性を誘導し、誘導用培地を除去後、 $500 \mu\text{M}$  エトキシシクマリン添加培地を加え、2 時間培養し、エトキシシクマリンからヒドロキシシクマリンへの変換量を蛍光分光光度計により定量した(Ex 390nm Em 440nm)。

【RT-PCR 法によるインテグリンの発現の確認】

RT-PCR 法により、インテグリン 1 サブユニットおよび 5 サブユニットの mRNA の発現量比較した。プライマー配列は次の通りである。

```

integrin 1 sense      ATAGGATTTTCACCCGTGTC
          antisense   ATCCTGTGTCCCATTGTAAG
integrin 5 sense      GGCAGCTATGGCGTCCCCTGTGG
          antisense   GGCATCAGAGGTGGCTGGAGGCTT
    
```

10. 結果

10-1. デキサメサゾン、インシュリン、EGF の効果

【3次元培養（細胞凝集体形成）と2次元培養（単層培養）における添加デキサメサゾン、インシュリン、EGF の細胞機能への効果の差異の確認】

培養初期における、細胞形態の変化および培養上清中のアルブミン量の比較を行った。コラーゲンコート上単層の形態を示し、アルブミン合成量は培養日数の経過とともに全ての培地で低下していった。一方、コラーゲングル上では、培養日数が経過するに従い、培地 F および H 以外では細胞凝集体を形成し、アルブミン合成量の増加回復が認められた。3次元培養（細胞凝集体形成）のほうが単層培養に比較し、ホルモン類等の添加の効果が顕著に現れている。

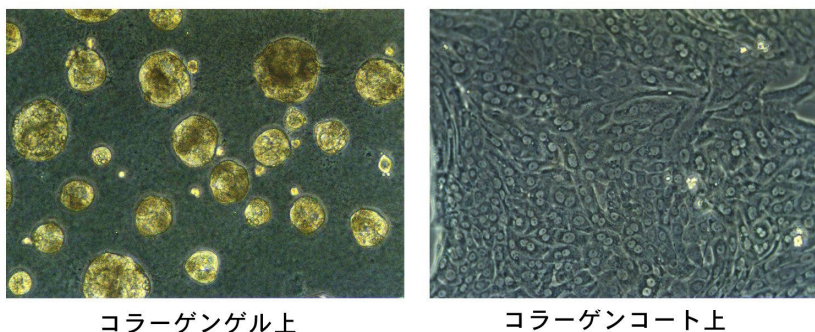


図1. コラーゲングル上とコラーゲンコート上で形態の差

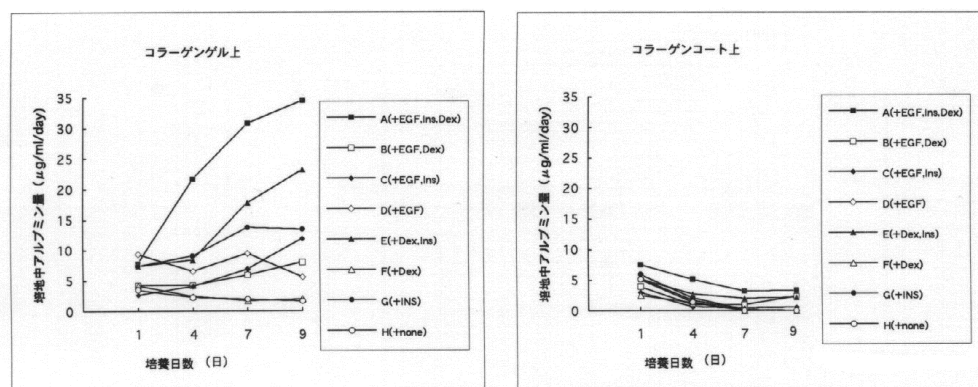


図2 培養初期でのコラーゲングル上およびコラーゲンコート上培養でのアルブミン合成量の変化の比較  
培地A~Hで各々培養を開始、培養上清中の1日あたりのアルブミン分泌量の変化をみた。

コラーゲンゲル上でのアルブミン合成量の変化から、細胞播種後、1 週間は細胞凝集体を形成する培養初期、それ以降を細胞凝集体の維持にあたる培養中期および後期とした。

【コラーゲンゲル上培養における添加デキサメサゾン、インシュリン、EGF の細胞凝集塊細胞の形成への効果】

デキサメサゾン、インシュリン、EGF の添加により、細胞凝集体の形成に変化があるかをみた。培地 A~H にて培養を開始しそのまま培養を続け、コラーゲンゲル上での細胞凝集体形成への、各添加ホルモン類の効果を見た。デキサメサゾンとインシュリンが添加された培地 A、E では輪郭のはっきりしたコンパクトで強固な細胞凝集体を形成した、培地 C、G では、細胞凝集塊を形成するが、輪郭ははっきりせずあまり強固なものは形成されなかった。アルブミン合成量の維持は培地 A、E が良好であった。

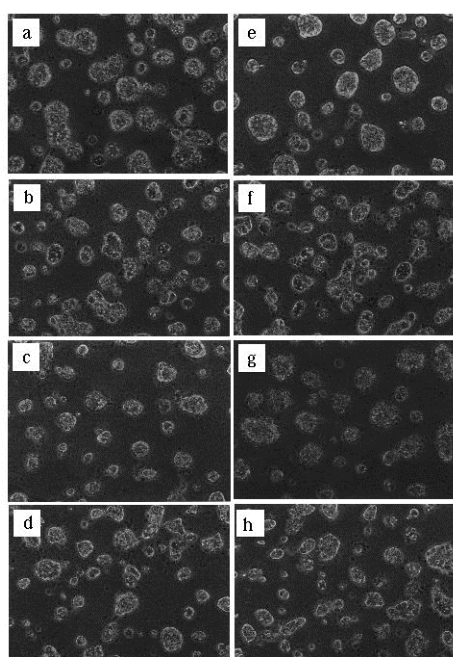


図3 インシュリン、デキサメサゾン、EGFの細胞凝集塊形成への効果  
a: EGF,INS,DEX b: EGF,DEX c: EGF,INS d:EGF e: INS,DEX f: DEX g: INSh:none

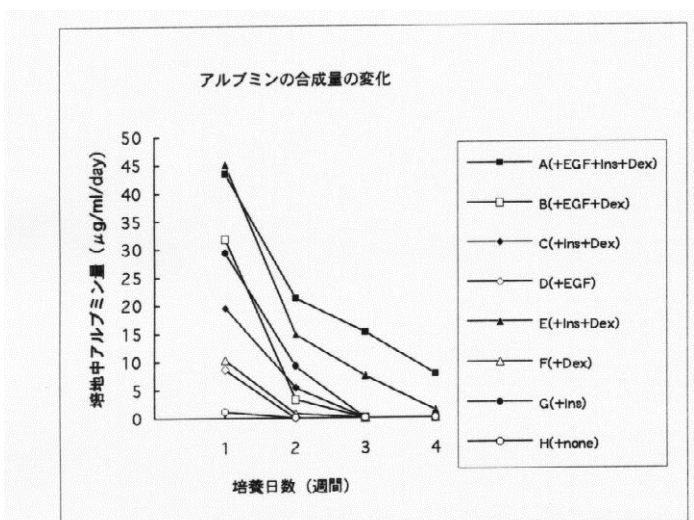


図4 コラーゲンゲル上培養での長期培養でのアルブミン合成量の変化  
培地A~Hで各々培養を開始、培養上清中への1日あたりのアルブミン分泌量の変化をみた。

【長期培養におけるデキサメサゾン、インシュリン、EGFの添加の効果】

下記のように培地を替え、

- 培養コース1 培地 A~H ( 1 週間)                      培地 A
- 培養コース2 培地 A ( 1 週間)                      培地 A~H ( 1 週間)                      培地 A

培養コース 1 では培養初期での、培養コース 2 では培養中期での添加の効果の確認を目的とした。

コース 1 における培養初期での添加物の効果を見ると、1 週間培養後全てを培地 A に切り替え、その後 3 週間培養を行ない、凝集体の形態の変化およびアルブミン合成量の変化をみた。デキサメサゾンとインシュリンを加えた培地 A、E で培養を開始した場合は、細胞凝集塊の形態は変化せず強固細胞凝集塊の形態を保った。アルブミン量は、培地 C、E、G で培養

を開始した場合、培地 A へ切り替え 1 週間では上昇が認められた。培地切り替え 2 週間目では全ての培地で下降が認められるが、培地 A と培地 E 以外での低下が著しい。長期培養では、培養初期における細胞のダメージからの回復が、後々の機能の維持に影響をおよぼし、培養初期ではインシュリンとデキサメサゾンの効果が大きく、特にインシュリンの添加が有効であることが判った。

コース 2 では、培地 A により培養を開始し 1 週間培養を行い細胞凝集塊を形成させた後、培地 A~H に切り替え、1 週間培養し、その後再び培地 A に全て戻し 2 週間培養を行った。途中、デキサメサゾンとインシュリンを添加した培地 A、E に切り替えた場合では細胞凝集塊の形態の変化はほとんどなかった。アルブミン合成量は培養日数が経るに従い低下が認められるが、細胞凝集体の崩壊、細胞の伸展を起こし培地 A、B、E 以外で大きかった。

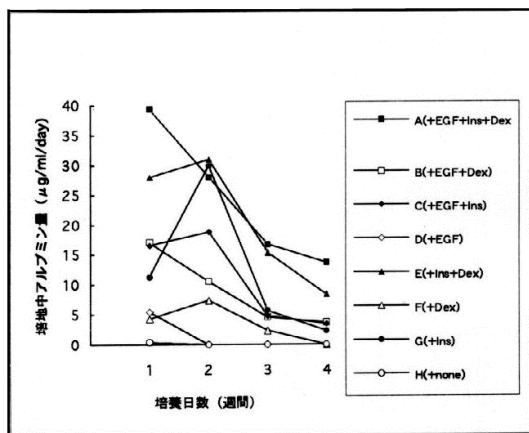


図5 培養初期におけるデキサメサゾン、インシュリン、EGFのアルブミン合成への効果  
培地A~Hで各々培養を開始し、1週間後全て培地Aに切り替え培養を継続し培養上清中へ分泌されるアルブミン量の変化をみた。

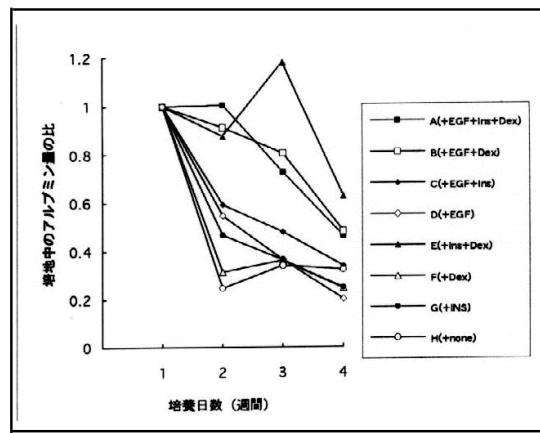


図6 培養中期におけるデキサメサゾン、インシュリン、EGFのアルブミン合成への効果  
培地Aで培養を開始し、1週間後に培地A~Hに各々切り替え1週間培養を行った後、再び培地Aで培養を行った。培地Aで1週間培養を行った時点でのアルブミン合成量を1とし、1日あたりの合成量の変化を比で示す。

以上の結果から、ペプシン処理の 1 型コラーゲンゲル上での、初代培養ラット肝細胞の細胞凝集体の形成や機能の発現維持には、培地に添加されるホルモン類等の影響が大きいことがわかった。添加ホルモン類としては、インシュリン、デキサメサゾン、の添加が必須である。

## 10-2 . DMSO の効果

### 【コラーゲンゲル上でのラット肝細胞細胞凝集体の形態への DMSO の効果】

ラット肝細胞をペプシン処理 1 型コラーゲン上に播種し 2 週間にわたり培養し、細胞凝集体の形成および形態の変化を EGF、デキサメタゾン、インシュリンを加えた培地について、DMSO の添加の有無で比較した。

DMSO を添加した場合は、コラーゲンゲル上で細胞凝集体を形成し、その形態は保持された。DMSO フリーでは培養初期では細胞凝集体を形成するものの、培養 1 週間あたりから細胞凝集体は伸展をはじめ、細胞凝集体同士が融合し、形態の変化が大きい。

### 【DMSO のアルブミン合成に及ぼす効果】

細胞播種後の機能の発現には、播種時の細胞の状態の影響が大きいため、播種時の細胞の状態を良好な状態に保つため、播種時は DMSO フリー、EGF、デキサメタゾン、インシュリンを添加した培地で 1 日間培養した後、各々の培地で培養し、培養 6 日目までの培養期間で、比較をおこなった。各培地間での培養上清中へのアルブミン産出量を比較した。アルブミン合成量は、インシュリン添加の群で多かった。DMSO の添加の有無による大きな違いは特に認められなかった。

### 【DMSO の P-450 活性誘導に及ぼす効果】

上記と同様に、播種時は DMSO フリー、EGF、デキサメタゾン、インシュリンを添加した培地で 1 日間培養した後、各々の培地で培養し培養 6 日目までの期間で、3-メチルコラントレンによる P-450 活性の差をみた。P-450 活性は、デキサメサゾン添加の培地で活性が高く、デキサメサゾン添加の培地で DMSO の添加により大きく抑制された。

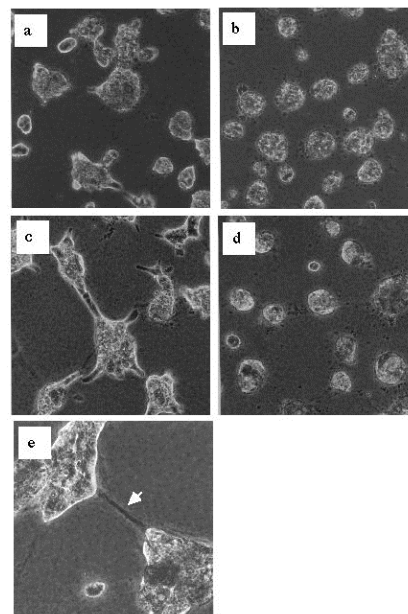


図7 ペプシン処理コラーゲン層上でのラット肝細胞の培養形態の変化  
a c: DMSOフリーの培地 b d: DMSO添加培地 a b: 培養7日目 c d: 培養14日目  
e: DMSOフリー培地7日目での拡大像(白矢印は細胞凝集体間に認められた橋状の構造)

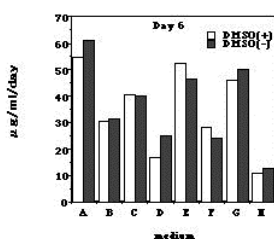
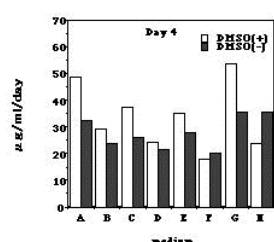


図8 アルブミン合成へのDMSOとEGF、インシュリンおよびデキサメタゾンの効果  
細胞播種後1日間培地A-DMSO(-)で培養後、各培地に切り替え培養を行い、培養4日目および6日目での培地中への1日あたりのアルブミン分泌量。

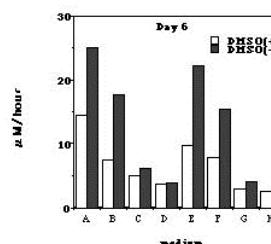
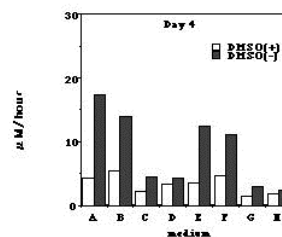


図9 P-450活性誘導へのDMSOとEGF、インシュリンおよびデキサメタゾンの効果  
細胞播種後1日間培地A-DMSO(-)で培養後、各培地に切り替え培養を行い、培養4日目および6日目に3-メチルコラントレンで誘導を行い、24時間後7-エトキシマリンの7-ヒドロキシマリンへの変換量を測定

## 10-3. スフェロイドを用いた DMSO のラット肝細胞細胞凝集体の形成のメカニズム解明の試み

### 【スフェロイド形成プレートでのラット肝実質細胞のスフェロイド形成とその形態の変化】

ラット肝実質細胞のスフェロイドは図 11 のように形成した、スフェロイド形成用プレートは、各ウェルは U 底を有し、細胞非接着性の処理を施しているため、播種されたラット肝実

質細胞は、自然とウエル中央に集まり、やがて単一のスフェロイドを形成する。細胞の播種からスフェロイドの形成まで、DMSO 添加培地または DMSO フリー培地中で培養を行った。肝実質細胞スフェロイドの形成過程での、培地への DMSO の添加の有無による形態の差異は認められなかった。

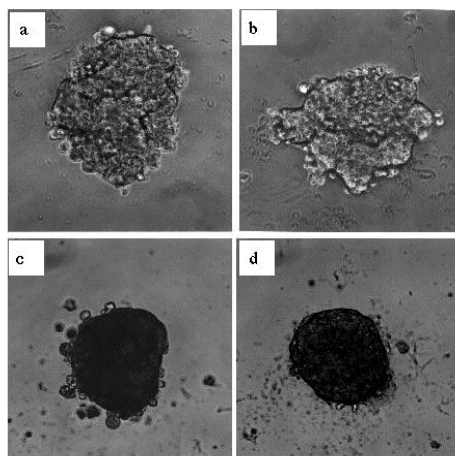


図11 U底プレートでのラット肝実質細胞のスフェロイドの形成形態  
 a c: DMSOフリー培地 b d: DMSO添加培地 ab: 播種後1日 cd: 播種後6日  
 スフェロイドの形成スピードおよび形態にDMSO添加による大きな差は認められなかった

【ラット肝実質細胞スフェロイドのコラーゲンゲル上への移植培養によるスフェロイドの形態変化】

スフェロイド形成用プレート中で、ラット肝実質細胞スフェロイドを形成させた、細胞の播種からスフェロイドの形成まで、DMSO 添加培地または DMSO フリー培地中で培養を行った。各々スフェロイドをペプシン処理 1 型コラーゲンゲル上に移植し、DMSO 添加培地で

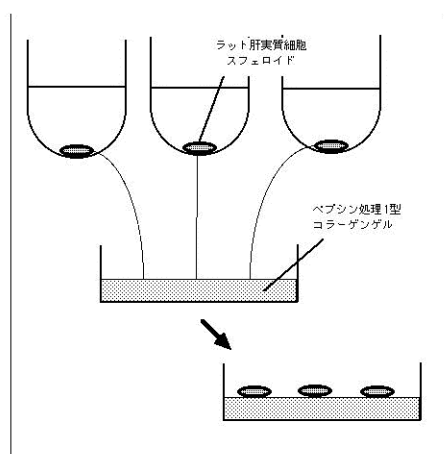


図12 ラット肝実質細胞スフェロイドのコラーゲンゲル上への移植実験の模式図  
 細胞非接着性U底ウエル中で形成させたラット肝実質細胞スフェロイドをペプシン処理1型コラーゲンゲル上に移植し、スフェロイドおよびコラーゲンゲルの形態の変化をみた

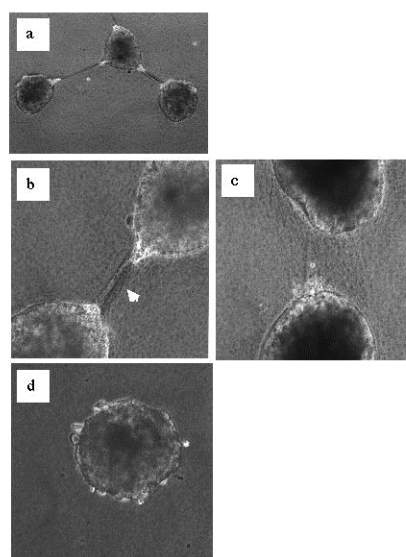


図13 ペプシン処理1型コラーゲンゲル上に移植されたラット肝実質細胞スフェロイドの形態変化  
 培養開始から6日後のスフェロイドをペプシン処理コラーゲンゲル上に移植し、培養1日後の形態。abd DMSOフリー培地、c: DMSO添加培地 a: 複数のスフェロイドの全体像 b c: 隣接するスフェロイドの拡大像 d: 近くに他のスフェロイドが存在しない場合 白い矢印はスフェロイド間に認められた縦線上の構造



形成したスフェロイドは DMSO 添加培地で、DMSO フリー培地で形成したスフェロイドは DMSO フリー培地で、培養を行い、形態の変化を観た。

DMSO フリーで形成させたラット肝実質細胞スフェロイドは、近傍にスフェロイドが存在すると、スフェロイド間にコラーゲンゲル中の構造変化をおこし、その構造変化にそって細胞が伸展していくのが認められた。一方 DMSO 添加培地で形成したスフェロイドは、近傍にスフェロイドが存在しても、スフェロイドの形態変は認められなかった。また DMSO フリーの培地で形成したスフェロイドでも近傍にスフェロイドが存在しないと形態の変化はおこさなかった。

### 【ラット肝実質細胞スフェロイドの接触培養によるスフェロイドの形態変化】

スフェロイド形成用プレート中で、ラット肝実質細胞スフェロイドを形成させた、細胞の播種からスフェロイドの形成まで、DMSO 添加培地または DMSO フリー培地中で培養を行った。各々の条件で形成したラット肝実質細胞スフェロイドをスフェロイド形成プレートのウエル中に 2 個ずつ移した、2 つのラット肝実質細胞スフェロイドは、U 底ウエルの中央で接触する。この状態で、DMSO 添加培地で形成したスフェロイドは DMSO 添加培地で、DMSO フリー培地で形成したスフェロイドは DMSO フリー培地で、培養を行い、形態の変化を観た。

DMSO フリーの培地で形成したラット肝実質細胞スフェロイドは、接触培養開始後 1 日で融合するのに対し、DMSO 添加培地では、融合は起こらない。

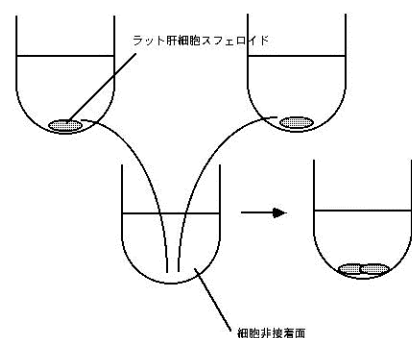


図 14 ラット肝実質細胞スフェロイドの接触試験模式図  
非細胞接着性U底ウエルで形成したラット肝実質細胞スフェロイドを2個  
非細胞接着性U底ウエルに移す、2個のスフェロイドはウエル中央で接触  
したかたちで培養される

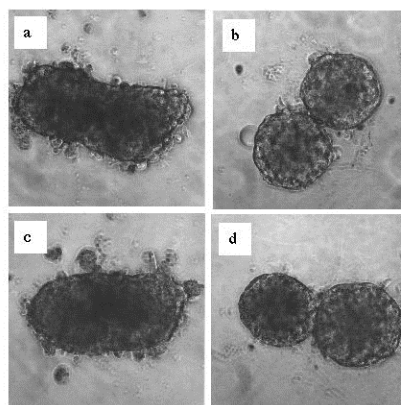


図 15 ラット肝実質細胞スフェロイドを接触させ培養したときのスフェロイドの  
形態の変化  
a c : DMSOフリー培地 b d : DMSO添加培地  
a b : スフェロイド接触後1日 c d : スフェロイド接触後2日

### 【ラット肝実質細胞スフェロイドのコラーゲンコート培養培養面への移植培養によるスフェロイドの形態変化】

スフェロイド形成用プレート中で、ラット肝実質細胞スフェロイドを形成させた、細胞の播種からスフェロイドの形成まで、DMSO 添加培地または DMSO フリー培地中で培養を行った。各々スフェロイドをペプシン処理 1 型コラーゲンをコートしたウエル中に移植した。DMSO 添加培地で形成したスフェロイドは DMSO 添加培地で、DMSO フリー培地で形成し

たスフェロイドは DMSO フリー培地で、培養を行い、形態の変化を観た。DMSO フリーの培地で形成したラット肝実質細胞スフェロイドは、コラーゲンコート上に移植することによって、即座に伸展しスフェロイドの形態は崩壊するのに対し、DMSO 添加培地で形成した肝実質細胞スフェロイドは、伸展が遅かった。

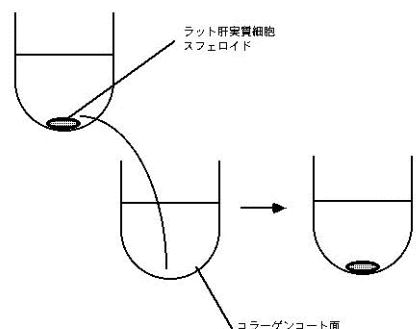


図16 ラット肝実質細胞スフェロイドの1型コラーゲンコート面上への移植実験模式図  
細胞非接着性U底ウエル中で形成したラット肝実質細胞スフェロイドを1型コラーゲンコートを描したU底ウエル中に移植し培養をおこなった。

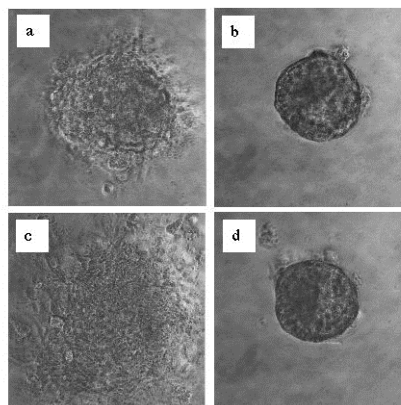


図17 1型コラーゲンコート上に移植したラット肝実質細胞スフェロイドの形態の変化  
移植後6日にスフェロイドを1型コラーゲンコート培養面に移植した  
a c: DMSOフリー培地 b d: DMSO添加培地  
a b: スフェロイドをコラーゲンコート上に移植後1日 c d: a b: スフェロイドをコラーゲンコート上に移植後2日

### 【RT-PCR 法によるインテグリンの発現の確認】

ペプシン処理 1 型コラーゲングル上で形成した細胞凝集体について、DMSO フリーの培地で細胞凝集体の形態変化が始まる培養 6 日では、インテグリン 1、インテグリン 5、ともに DMSO 添加培地で発現が抑制されていた。

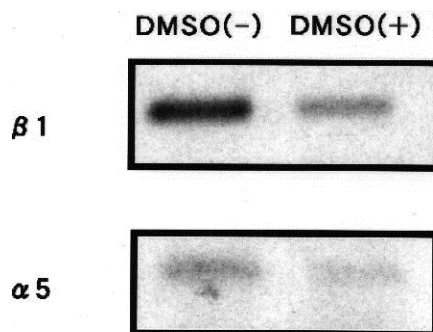


図18 RT-PCRでのインテグリンβ1サブユニットおよびα5サブユニットのmRNAの発現の確認  
コラーゲングル上で培養開始後 6日

## 11. 考察

### 【デキサメタゾン、インシュリンおよび EGF の効果】

コラーゲングル上でのラット肝細胞の初代培養において、培地中に生理的活性物質としてデキサメタゾン、インシュリン、EGF、その他添加物として DMSO を添加し、培養を行うとコラーゲングル上に細胞凝集塊を形成し、アルブミン合成などの機能が長期に亘り維持される。

これらのなかでまず、生理的に活性のあるデキサメサゾン、インシュリン、EGF について細胞凝集塊の形成過程、形成後の細胞凝集塊の維持、および機能の維持への効果をみた。コラーゲンゲル上培養とコラーゲンコート上での培養の比較において、コラーゲンゲル上では培養初期において、培養日数の経過とともに細胞凝集塊を形成し、アルブミン合成能の上昇が認められる。一方コラーゲンコート上では単層を形成し、アルブミン合成量の上昇は認められない。コラーゲンゲル上培養における、アルブミン量の上昇は、インシュリンとデキサメサゾンが添加された培地において大きい。両培地では細胞凝集塊の形成が早く、形態的にコンパクトで強固な細胞凝集塊を形成しており、細胞凝集体の形態の形成および機能の発現の回復にインシュリンとデキサメサゾンが特に有効であることが判った。コラーゲンゲル上で細胞体を形成した以降のデキサメサゾン、インシュリン EGF の効果をみると、インシュリンとデキサメサゾン効果が大きく、細胞凝集体の形態の維持およびアルブミン合成量の維持に必須であった。以上から、コラーゲンゲル上でのラット肝細胞の初代培養での細胞凝集塊の形成と機能維持においては、インシュリン、デキサメサゾンの効果が大きく添加は必須であることが判った。これらの添加物の要求性は、単層培養と同じであり、細胞採取播種後の細胞のダメージの回復がインシュリンとデキサメサゾンの添加によりはやいため、より良い細胞凝集体の形成がなされるものと思われる。

また、今回コラーゲンゲル上での検討により、これら添加物の効果を単層培養に比較し、より明確に評価できたと思われる、EGF の添加はそこそこ有効であるがデキサメサゾン添加により有効性が増していると考えられ、デキサメサゾン添加の応答性が、細胞凝集体形成による機能の発現維持に関っているととも考えられる。

#### 【DMSO の効果】

本培養方法の中で、生体から全くかけはなれている要因として挙げられるのが、DMSO の添加であり、検討を行った。その効果をみると、細胞凝集体の形態の形成および維持に必須であった。

また、機能の発現への影響をみると、3-メチルコラントレンによる P-450 活性誘導に有効に働いたのは、デキサメサゾンであり、さらにデキサメサゾン添加群で DMSO 添加により P-450 活性の抑制が認められたことから DMSO との相互作用が示唆される。デキサメサゾンも DMSO も細胞分化を促進することとして知られ DMSO とデキサメサゾンでは作用的に類似した報告がなされている。DMSO の作用によるあるデキサメサゾンと共通の細胞応答の亢進が、デキサメサゾンへの応答性を抑制しているのかもしれない。また、デキサメサゾンの作用そのものを抑制しているのかもしれない。

ペプシン処理 1 型コラーゲンゲル上に播種された、ラット肝実質細胞はコラーゲンゲル上に接着しながら、伸展せず、やがて近傍の細胞同士が凝集体を形成する、やがて培養開始御 1 週間あたりから、DMSO フリーの培地で培養をおこなったものは、細胞凝集体が伸展し始めるのが認められた。一方、DMSO を添加した培地で培養をおこなったものは、細胞凝集体の形態を保持していた。低架橋処理したコラーゲン上でのラット肝実質細胞の長期培養にて DMSO の添加により肝細胞機能がより長期にわたり維持されると報告されているが、

DMSO による機能維持の効果は、このような細胞凝集体の維持にあると思われ、細胞凝集体の形成と維持における DMSO の効果について考察を行った。

DMSO フリーの培地でのコラーゲングル上でのラット肝実質細胞の形態の変化の特徴は、いったん形成された細胞凝集体同士が、御互いに引きあうかたちで細胞凝集体の方向に向かって伸展し、やがて一つになる、その際細胞凝集体の間には、コラーゲングル中に太い線維維持上の構造が現れ、その繊維に向かって細胞が伸展していくことにある。あたかも、細胞細胞凝集体間で連絡をとりあい、御互い一つになるように見える。その過程はまず、低架橋のコラーゲングルの構造を変化させ硬いコラーゲンの足場を構築し、その足場を掛け橋として伸展し融合すると思われる。そこで、細胞凝集体の独立性（細胞凝集体同士融合しようとしな）、コラーゲン構造への変化への応答性（硬いコラーゲンへも応答しない）への効果についてスフェロイドによりモデル実験を試みた。

DMSO フリーで形成させたラット肝実質細胞スフェロイドは、近傍にスフェロイドが存在すると、スフェロイド間にコラーゲングル中の構造変化をおこし、その構造変化にそって細胞が伸展していくのが認められ、一方 DMSO 添加培地で形成したスフェロイドは、近傍にスフェロイドが存在しても、スフェロイドの形態変は認められなかった。細胞凝集体の形態の変化は、近傍の細胞凝集体同士の作用によりおこること、そして DMSO は、この細胞凝集体同士の相互のやりとりを抑制する可能性が示唆された。

さらに、DMSO の添加により、1) 細胞凝集体の融合性は抑制されるのか、2) 細胞凝集体のコラーゲン構造の変化への応答性に差があるのかについて、同じくラット肝実質細胞スフェロイドを用いて確認した。

予め形成したスフェロイドを接触させながら培養し、スフェロイドが融合するかをみた、DMSO フリーの培地で形成したラット肝実質細胞スフェロイドは、接触培養開始後 1 日で融合するのに対し、DMSO 添加培地では、融合は起こらない。DMSO は細胞凝集体の融合性を抑制することが確認された。

また、予め形成したスフェロイドを、1 型コラーゲンをコートした培養面に移植した場合の形態の変化をみた、すなわちコラーゲンの構造の変化に対する応答性に差があるかみた。DMSO フリーの培地で形成したラット肝実質細胞スフェロイドは、コラーゲンコート上に移植することによって、即座に伸展しスフェロイドの形態は崩壊するのに対し、DMSO 添加培地で形成した肝実質細胞スフェロイドは、伸展が遅い。この実験から、DMSO は細胞凝集体のコラーゲンの構造変化への応答性も抑制していることが確認された。

ペプシン処理 1 型コラーゲングル上で形成した細胞凝集体について、DMSO フリーの培地で細胞凝集体の形態変化が始まる培養 6 日では、インテグリン 1、インテグリン 5、ともに DMSO 添加培地で発現が抑制されており、コラーゲンの構造の変化に対する応答性への抑制効果はインテグリンの発現の抑制によるものと思われる。

DMSO は、培養細胞の分化誘導促進剤として、使用されている一方、肝細胞の培養においては、従来の単層培養では、DMSO の添加により長期培養が可能になりギャップジャンクションを形成するコネクシン 26、36 の発現が維持されると報告されている。

細胞凝集体の形成に DMSO がどのようなメカニズムにより作用しているのかは依然不明で

あるが、DMSO の添加により、細胞凝集体内でのセルセルコミュニケーションが促進されるとの報告やセルセルコンタクトとインテグリンの発現の相関も報告されており、ペプシン処理 1 型コラーゲン上での DMSO 添加の効果は、細胞凝集体の独立性を高め、細胞凝集体の相互作用を抑制することにより、形成した細胞凝集体の形態を維持し、細胞機能の維持が可能となることが示唆される。

以上から、低架橋 1 型コラーゲンゲル上でのラット肝細胞の細胞凝集体形成培養において、培地へのインシュリン、デキサメサゾン、DMSO の添加が必須であり、肝細胞のサバイバルおよび機能の発現にはインシュリンとデキサメサゾンが、細胞凝集体の形成および維持には DMSO の効果が大きいことが判った。

## 12. 今後の展開

低架橋コラーゲンゲルの細胞凝集体の形成および維持、また機能の維持への培地添加物の効果を検討し、インシュリン、デキサメサゾン、DMSO の添加が有効であり、かつ必須であることを確認した。生体により近い培養環境を目指し検討されている本培養方法であるが、細胞機能の発現という観点からは、より生体に近づいたといえる。しかし、培地への添加物の有効性は改善されているが、要求性は改善されておらず、また DMSO という生体に存在しないものの添加が必須であり、生体内の培養環境からは程遠いものである。本培養方法を、細胞毒性などの評価に応用しようとしたばあい、より生体に近い環境への改善が必要であり、そのためには、細胞凝集体の形成による有効性のメカニズムを知る必要がある。

## 13. 研究業績

13-1. 原著論文 なし

13-2. 総説など なし

13-3. 国際学会発表 なし

### 13-4. 国内学会発表

- 1) 横山兼久、松田尚樹、竹下哲史、渡邊正己: 初代培養ラット肝細胞細胞凝集塊形成へのデキサメタゾン、インシュリン、EGF の効果、日本組織培養学会第 69 回大会、広島 (1996)
- 2) 横山兼久、松田尚樹、竹下哲史、渡邊正己: 初代培養ラット肝細胞細胞凝集塊形成へのデキサメタゾン、インシュリン、EGF の効果、第 3 回肝細胞研究会、広島 (1996)
- 3) 横山兼久、松田尚樹、竹下哲史、森田直子、渡邊正己: DMSO によるラット肝細胞凝集体の形態維持機構について、日本組織培養学会第 70 回大会 横浜(1997)

13-5. 新聞など なし

13-6 . 特許

1) 出願 発明の名称「初代培養肝細胞の細胞凝集塊およびその形成方法」

14 .

(1) Responsible factors for cluster formation and functional maintenance of rat hepatocyte.

(2) Laboratory of Cell and Stress Biology, JST at Nagasaki

(3) Kanehisa Yokoyama

(4) Naoki Matsuda, Satoshi Takeshita and Masami Watanabe

(5) 1995-1996

(6) Abstract

In this study, we examined effects of dexamethasone, insulin, EGF and DMSO on forming cluster culture of rat hepatocytes on collagen gel. Dexamethasone and insulin and DMSO are essential for forming compact and tightly-packed clusters and maintaining them. Dexamethasone and insulin are essential to maintain cell function of rat hepatocytes. Especially, DMSO plays one of most important role for forming and maintaining clusters. In the presence of DMSO, the clusters structure was well maintained. Therefore, it was suggested that the formation and maintenance of cluster is important for maintenance of cellular functions on collagen gel.