

1. 研究課題名：細胞凝集体の構築技術と、細胞機能調節技術の開発

2. 研究機関：秋田住友ベーク（株）

3. 分担者：河村健司

4. 共同研究者：森田直子（秋田住友ベーク（株））

横山兼久（科学技術振興事業団・長崎研究室）

松田尚樹（科学技術振興事業団・長崎研究室）

5. 研究期間：平成9年4月～平成9年12月

6. 要約

我々は、96穴U底プレートに細胞非接着性を付与することにより、1つのウェルに1つの細胞凝集体を形成できる培養プレートを開発した。この培養プレートは、コラーゲンなどの細胞外マトリックスの無い環境下で細胞凝集体を形成できること、およびウェルへの播種細胞数により細胞凝集体の大きさを制御できることにある。このプレートを用い、機能性細胞の代表格であるラット初代培養肝細胞の細胞凝集体の形成性、凝集体の形成と機能の発現の相関、細胞凝集体中の機能発現部位、および細胞凝集体の微細構造を観察した。

本細胞凝集体形成プレートにより、コラーゲンなどの細胞外マトリックスの存在しない環境下、ラット初代培養肝細胞を用い、播種細胞に応じた細胞凝集体を得ることができ、また、細胞凝集体の形成と機能の発現に相関があることを確認した、さらに、細胞凝集体の微細構造およびアルブミン蛋白の分布状況から、凝集体における機能の発現が一様では無い可能性を示唆する知見を得、またさらに、細胞凝集体はより生体に近い構造およびより分化した状態にあるという知見を得た。

7. 目的

種々の目的で多くの動物細胞が培養されている。培養器は、古くはガラス製のシャーレ等が使用されていたが、再利用するための洗浄・滅菌工程が煩雑であり、破損し易いという欠点があった。そこで、主として透明性、成形性、コスト等の観点からポリスチレンを主原料とするプラスチック製の培養器として、シャーレ、フラスコ、プレート等が登場し、広く普及するに至った。

細胞という観点からみると、種々の株細胞が樹立され、細胞バンクが分譲を開始したが、今では試薬メーカー等が細胞を販売するにいたり、種々の株細胞が容易に入手できるようになっている。これらの人為的に修飾加工された細胞は、使用目的によっては極めて有益であるが、ほとんどの場合、生体内に存在する正常な機能を有する細胞ではない。しかし、動物の正常細胞やヒトの正常細胞を使用し、生体内と等価の研究を生体外で行うことが重要であるとされ、最近では、ラット等の動物由来の血管内皮細胞、乳腺上皮細胞、神経細胞をはじめ、ヒト由来の表皮角化細胞、臍帯血管内皮細胞等が市場に登場するに至っている。

しかしながら、これらの正常細胞特にヒト由来の正常細胞は、一般的に培養が難しく通常の細胞培養器では細胞の機能維持は勿論、細胞の生存を維持することすら困難である。そこで、培養器表面をコラーゲンやゼラチンのような蛋白質で処理した培養器が登場するとともに、新しい培養液が続々と開発されつつある。

比較的最近では、多糖類(1)やマトリゲル(2)(特殊なゲル)で表面処理した培養器で正常細胞を培養すると、細胞がスフェロイド(3次元的な凝集体)を形成し、その形態で細胞機能を発現し長期に維持することが分かってきた。また、スフェロイドの形成方法も種々の方式(3)が報告されるようになってきた。

我々は、96穴U底プレートに細胞非接着性を付与することにより、1つのウェルに1つの細胞凝集体を形成できる培養プレートを開発した。この培養プレートは、コラーゲンなどの細胞外マトリックスの無い環境下で細胞凝集体を形成できること、およびウェルへの播種細胞数により細胞凝集体の大きさを制御できることにある。

機能性細胞の代表格である、肝細胞を題材とし、上記のような、プレートの特徴を活かした実験系での、細胞凝集体の形成および機能の発現の特徴を観、得られた知見から、本細胞凝集体形成プレートの改良および培養方法の改良つなげる情報を得ることを一つの目的とし、またさらに、本プレートより得られた細胞凝集体について、形態的な面からの考察を加えることにより、細胞凝集体の形成による、3次元構造の構築の様子を明らかにし、3次元培養と機能発現への相関への接点となる知見を得ることを目的とした。

8. 材料と方法

1) 培養器

U底96穴マルチウェルスフェロイド形成プレート(仮称)

2) ラット肝細胞の採取および細胞浮遊液の調製

ウィスター系ラット雄 5~6週齢より、コラゲナーゼ灌流法(4)によりラット肝実質細胞を分離採取した。培地は、L-15培地に、10%FBS、2% DMSO、30 μ g/ml L-プロリン、10⁻⁷M デキサメサゾン、10⁻⁷M インシュリン、10ng/ml EGF、102unit/ml ペニシリンGカリウム、0.2 μ g/ml 硫酸ストレプトマイシンを添加したものをを用いた。

3) ラット初代培養肝細胞の播種細胞数と細胞凝集体の形成性の確認

分離直後のラット肝実質細胞を U 底 96 穴マルチウェルスフェロイド形成プレート1ウェルあたり、250、500、1000、2000、5000、10000 個播種し、1週間にわたり培養を行った。培地は上記培地を用い、培地量は 100 μ l/ウェルとし、培地交換は播種後実施しなかった。培養は炭酸ガスインキュベーター中、37^oC、5%-CO₂、湿度 100%で培養を行った。細胞凝集体の形成過程は、位相差倒立顕微鏡により行った。

4) ラット初代培養肝細胞の細胞凝集体の形成と機能の相関の確認

分離直後のラット肝実質細胞を U 底 96 穴マルチウェルスフェロイド形成プレート1ウェルあたり、250、500、1000、2000 個播種した。培地は上記培地を用い、培地量は 100 μ l/ウェルとし、培地交換は播種後実施しなかった。培養は炭酸ガスインキュベーター中、37^oC、5%-CO₂、湿度 100%で培養を行った。

アルブミン合成量は、ELISA法を用い、サンドイッチ法により行った。

P-450誘導活性は、3-メチルコラントレンを培地中に添加し、24時間培養後、7-エトキシクマリンを添加し、2時間培養を行い、7-エトキシクマリンの7-ヒドロキシクマリンへの変換量を蛍光分光光度計により測定した。

5) ラット初代培養肝細胞の細胞凝集体中のアルブミン分布の確認

分離直後のラット肝実質細胞を U 底 96 穴マルチウェルスフェロイド形成プレート1ウェルあたり、500 個播種し、1 週間培養し形成させた細胞凝集体を 10%ホルマリンにより固定し、メタノールで処理後、FITC-ラベル抗ラットアルブミン抗体を反応させ、洗浄後、凝集体をつぶさないためにスペーサー（厚み 500 μ）を設けたスライドガラス上に移し、カバーガラスでカバーし、共焦点レーザー顕微鏡により細胞凝集体中のアルブミン分布を確認した。

6) ラット初代培養肝細胞の細胞凝集体内部の微細構造の確認

分離直後のラット肝実質細胞を U 底 96 穴マルチウェルスフェロイド形成プレート1ウェルあたり、500 個播種し、1 週間培養し形成させた細胞凝集体を 2%グルタルアルデヒドにより固定し、メタノールにより脱水した後、エポキシ樹脂中に抱埋し、切片を切り出し、透過型電子顕微鏡により観察した。

7) ラット初代培養肝細胞細胞凝集体表面の微細構造の確認

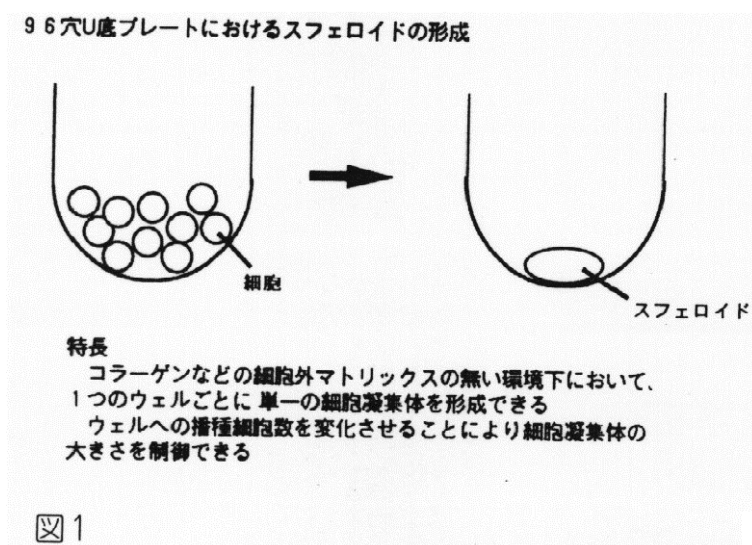
分離直後のラット肝実質細胞を U 底 96 穴マルチウェルスフェロイド形成プレートに1ウェルあたり、500 個播種し、1 週間培養し形成させた細胞凝集体を 10%ホルマリンにより固定し、PBS(-)で洗浄後、メタノールで洗浄したのち、自然乾燥後ステージ上に固定し気層中で、原子間力顕微鏡により細胞凝集体表面の凹凸像を得た。

また、コラーゲンコート上で、5 日間単層培養した、ラット実質肝細胞を上記と同様の処理を施し、同じく気層中で原子間力顕微鏡により細胞凝集体表面の凹凸像を得た。

9. 結果

1) ラット初代培養肝細胞における細胞凝集体の形成性

本プレートでは、ウェル中に細胞を播種すると、細胞はウェル中央に重力で集まり、お互いに細胞同士が接しあい凝集を起し、単一の細胞凝集体を形成することを（図 1）、HeLa、Hep G2、V79 などの株化細胞により確認している（データ添付せず）。上記のような接着性の株化細胞の場合、かなり広い播種細胞数の範囲で単一の細胞凝集体の形成が可能であり、



播種細胞数が 10 万個/ウェルというかなりの細胞数での単一な凝集体の形成が可能であった（データ添付せず）。株化細胞の場合、分化の程度も低く細胞凝集体の形成は容易であると考えられ、肝細胞のような分化の程度の高い細胞での凝集体の形成性が異なると思われ、まず、凝集体の形成と機能発現との相関を観る前に、ラット肝細胞における、本プレートでの播種細胞数による細胞凝集体の形成特性、凝集体の形成過程の特徴について、観察を行った。

ラット肝細胞の播種細胞数は、250 個/ウェルから 10000 個/ウェルまでとし、細胞凝集体の形成過程および単一凝集体が形成できるかを確認した。250 個/ウェル～1000 個/ウェルまでは、再現性良く単一な細胞凝集体を形成し、250 個/ウェル、500 個/ウェルでは、培養 3 日目ではほぼ単一な細胞凝集体を形成し、1000 個/ウェルでは細胞数約 200 個程度と思われる細胞凝集体を培養 3 日目では形成し培養 7 日目あたりで単一な細胞凝集体を形成した、細胞播種数が少ないほど単一な細胞凝集体の形成は早い傾向にあった（図 2）。2000 個/ウェル～10000 個/ウェルでは、細胞集合群の周辺部でまず小さな凝集体を形成し、それらが不完全に融合しあいドーナツ状の細胞凝集体の集合体を形成する傾向にあり、単一な凝集体の形成が困難であった。2000 個/ウェルでは、単一な細胞凝集体を形成する場合もあるが、5000 個/ウェル、10000 個/ウェルでは、ウェル中に単一な細胞凝集体を形成することは全く出来なかった（図 2）。単一な細胞凝集体の形成可能な細胞播種数のボーダーラインは 1000 個/ウェル～2000 個/ウェルあたりにあることが確認された（表 1）。

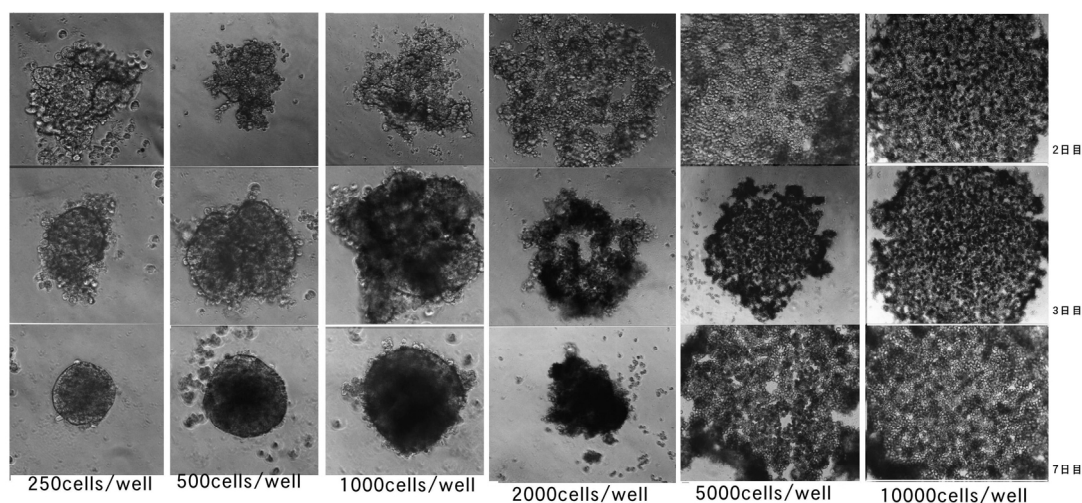


図2-スフェロイドの形成性

播種細胞数	250	500	1000	2000	5000	10000
スフェロイド形成性	○	○	○	△	×	×

○：形成する △：どちらともいえない ×：形成しない

表 1 ラット初代培養肝細胞の播種細胞数とスフェロイド（細胞凝集塊）の形成性

2) ラット初代培養肝細胞の細胞凝集体形成と機能の発現

上記細胞凝集体の形成性の結果をふまえ、250 個/ウェル~2000 個/ウェルの肝細胞を播種し、細胞凝集体の形成と機能の発現の相関を観た、機能としては、アルブミン産生量と 3-メチルコラントレンによる P-450 誘導活性をみることによりおこなった。1 日あたりのアルブミン産生量では、播種細胞数 250 個/ウェルでは培養 2~3 日に、500 個/ウェルでは培養 4 日目から 5 日目に、1000 個/ウェルでは培養 7 日あたり、2000 個/ウェルでは培養 7 日あたりにピークが認められ、ピークのあと急激に下降が認められたあと、一過性な上昇のあと再び減少し、培養 15 日程度、アルブミン産生が認められた(図 3)。250 個/ウェル、500 個/ウェル、1000 個/ウェルでは単一細胞凝集体の形成スピードと機能発現ピークとの相関が認められた。一方、3-メチルコラントレンによる P-450 誘導活性は、播種細胞数 250 個/ウェル、500 個/ウェルでは、培養 7 日で、1000 個/ウェルでは培養 10 日、2000 ウェルでは培養 7 日で誘導活性のピークが認められた(図 3)。P-450 誘導活性においては、単一細胞凝集体の形成と活性のピークの明確な相関は確認できなかった。

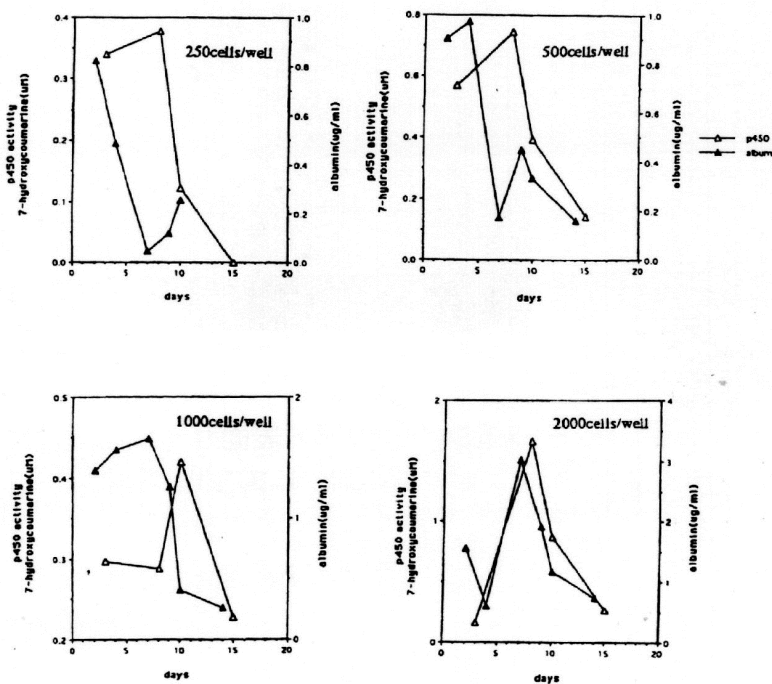


図 3
各播種細胞数における
アルブミン生産量および
P-450誘導活性の変化

3) ラット初代培養肝細胞の細胞凝集体の形態的特徴の確認

FITC ラベル抗ラットアルブミン抗体により染色し、共焦点レーザー顕微鏡により、アルブミンの分布状況および細胞凝集体形成する細胞形態を確認した、蛍光は細胞凝集体表面しか染まらず、染まった表面細胞の形態は扁平に近く、単層培養での細胞の形態に近かった(図 4)。また、細胞凝集体の形は厚さ約 30~40 μm 程度直径 300~400 μm 程度の丸餅状をしていることも解った。(図 4)

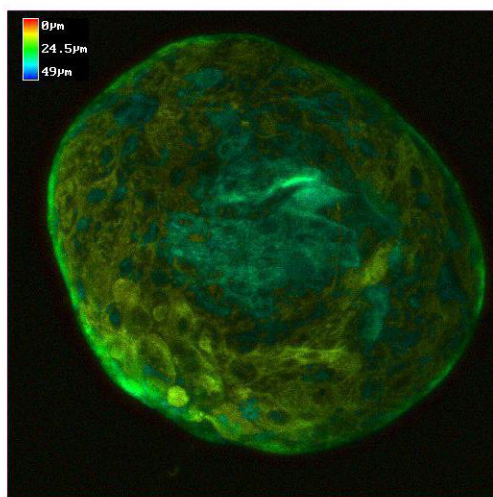


図4. FITCラベル抗ラットアルブミン抗体で染色したラット肝細胞のスフェロイドの3次元蛍光像

透過型電子顕微鏡では、観察用切片の断面の光顕による観察でも細胞凝集体表面および内部の細胞の形状は確認でき、表層細胞は扁平、第二層からは球形に近いことが確認できた（データ添付せず）。実際の透過型電子顕微鏡観察では、表層細胞の形状が扁平なことは確認できた、さらに、表層細胞では細胞内部のミトコンドリアの量が細胞凝集体内部の細胞に比べ多いのが認められた（図5）。また、細胞と細胞の接着部には、微細胆管様の構造も認められ、細胞凝集体表面細胞には微柔毛様の構造も認められた（図6）。



図5. スフェロイド表面から内部へのTEM像（×1000）

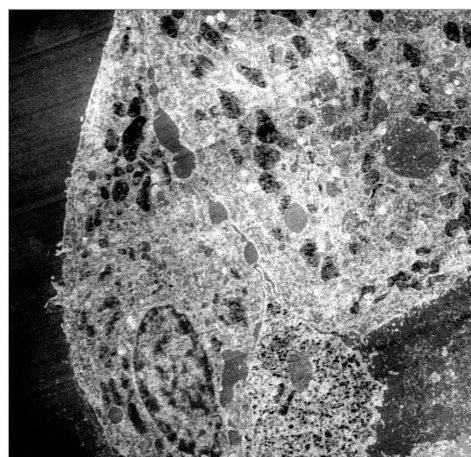


図6. スフェロイド表層部から内部のTEM像（×1000）

原子間力顕微鏡像では、今回ホルマリンによる固定はおこなったが、電顕のような後行程を必要とすること無く、より培養形態に近い形での、細胞凝集体の表面像を得ることができた。得られた原子間力顕微鏡像は、細胞凝集体表面が微柔毛様の構造で覆われていることを示していた（図7）。一方、モノレイヤーでは、細胞表面の微柔毛の存在は確認できなかった、また、細胞と細胞間の間隙が認められた（図8）。



図7-1. スフェロイド表面の原子間力顕微鏡像

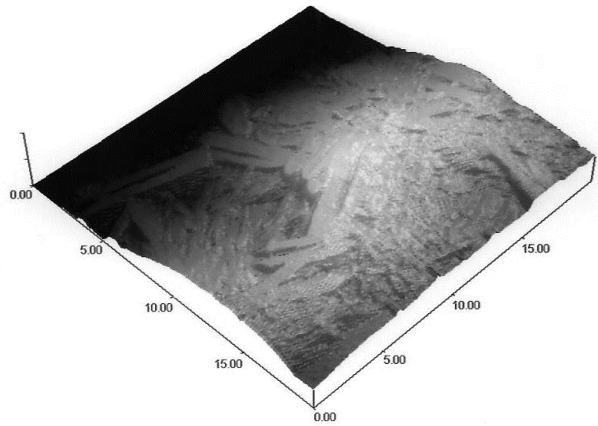


図7-2. スフェロイド表面の原子間力顕微鏡3次元構築像

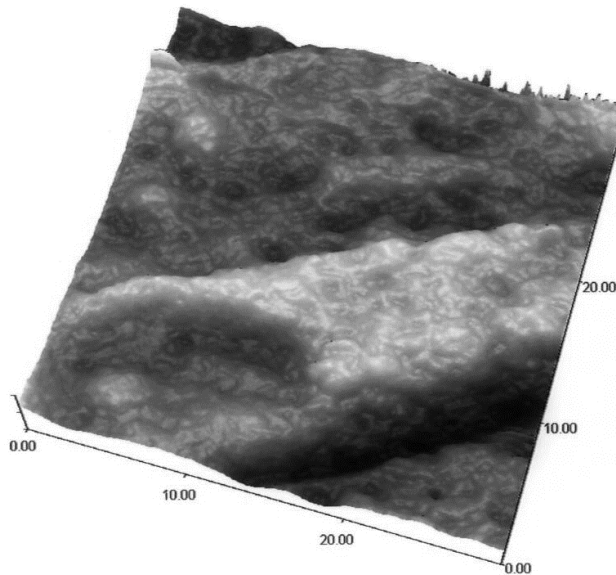


図8. ラット初代培養肝細胞の単層培養での原子間力顕微鏡での3次元構築像

以上の微細構造の観察から、形態的に細胞凝集体では、より生体に近い構造の構築が成されており、またさらに分化した状態にあることが示唆されていた。また、凝集体表面の細胞と内部の細胞の状態が異なることも確認した。

10. 考察

1 ウェルあたりの細胞播種数をかえて細胞凝集体の形成性をみた、播種細胞数が少ない場合は、細胞凝集体の形成が速くかつ単一の凝集体を形成することができた、一方細胞播種数が多い場合、細胞凝集体の形成は遅く、また小さな凝集体を形成するものの単一の凝集体の形成には至らない。このことは、細胞凝集体形成における凝集体の至適なサイズがあり、それ以上おおきなサイズの凝集体を創らない性質が、元々肝細胞に存在する可能性もある。ラ

ット肝細胞においては、様々方法での細胞凝集体の形成方法が試みられており、その形成性が報告されている。例えば細胞非接着性のディッシュを用い旋回培養により細胞凝集体を形成する方法や、培養面をプラスにチャージさせたディッシュを用いた方法などがある、何れの方法でも細胞数が何千という細胞凝集体はを創ったという報告はない。

サンプリングチューブ中で遠心により強制的に凝集体を形成させ多数個の肝細胞からなる細胞凝集体を創る例もあり、ウェルの先端形状をもっと鋭くし強制的に細胞を集めれば、もっと大きな細胞凝集体を形成することも可能かもしれない。しかし、元来肝細胞は酸素多く必要とするため、大きな細胞凝集体を形成したとしても、凝集体内部はネクローシスを起こし、細胞凝集体全体の状態が悪くなり、肝細胞における三次元培養の第一の目的である、細胞の機能の発現および維持を達成することは難しくなると思われる。

また、細胞凝集体の形成と機能発現について、細胞凝集体の形成過程と機能の発現の相関を調べた。細胞凝集体の形成はウェルあたりの播種数が少ないほうが早くかった。それに相関するかのようにアルブミンの合成能は、培養日数の経過とともに回復し、細胞凝集体の形成が早い播種細胞数ほどピークが早く現れることが確認された。このことは、細胞凝集体の形成が、機能の発現に必要なことを示唆していると思われる。単に、丸い細胞の形態であれば良いのではなく、凝集体としての組織構築が必要であることが示唆された。アルギン酸中に、細胞個々の状態で肝細胞を抱埋した場合と細胞凝集体を形成した後アルギン酸中に抱埋した場合の細胞機能の発現を比較すると凝集体を形成したほうが機能の発現レベルが高いという報告もある。ピークの後培養 10 日目あたりで再びアルブミン合成量が増加し、小さなピークが認められるが、このピークのと細胞凝集体の崩壊が認められたことから、これは細胞凝集体の状態が悪くなり、その応答反応として一過性にアルブミン合成が高まったと考えられる。3-メチルコラントレンによる p-450 誘導活性は、各播種細胞数ともピークの現れる培養日数はほぼ一致しており、細胞凝集体の形成スピードとの相関は認められない、しかし、細胞凝集体を形成しない場合は、p-450 活性のレベルは低いことを確認しており（データ添付せず）、凝集体の形成は高いレベルでの p-450 活性誘導には必須であると考えられる。P-450 とアルブミンの機能発現の差は、機能の発現メカニズムの差であると思われる。

細胞凝集体の微細構造を、共焦点レーザー顕微鏡、透過型電子顕微鏡、原子間力顕微鏡にて観察を行った。共焦点レーザー顕微鏡では、細胞凝集体中でのアルブミンの発現部位を確認し、透過型電子顕微鏡では細胞凝集体内部の微細構造を確認し、原子間力顕微鏡では、凝集体表面の微細構造を確認した。共焦点レーザー顕微鏡でのアルブミンの分布の結果からアルブミン合成が細胞凝集体表面の細胞中に遍在している可能性が示唆され、また、透過型電子顕微鏡像での細胞中のミトコンドリアの数が凝集体表面の細胞に多く認められることから、活発に機能を発現しているのは凝集体表面の細胞であると思われる。肝細胞は、培養において酸素を必要とする細胞と言われ、細胞凝集体内部は酸素の少ない環境にあると思われ、休眠状態にあるのではないかとと思われる。

また、細胞凝集体の細胞形態をみてもみると、凝集体表面の細胞は扁平に近く、形態的には、単層培養の場合とあまり大差はないことが確認された、このことから細胞の形は機能の発現に大きな要因とならないことが示唆される。三次元構造の構築が機能の発現に大きく関与し

ていることが、このことから解る。透過型電子顕微鏡像からも、細胞凝集体内部では、微細胆管様の構造部位が認められ、微視的にも三次元構造が構築されていると考えられる。

また、凝集体表面の原子間力顕微鏡像から、微柔毛様の構造が確認され、この微柔毛は、細胞の分化の程度の指標とも言われ、凝集体表面に微柔毛様の構造が認められ、一方単層培養では認められないことから、細胞凝集体中の肝細胞はより分化した状態にあることが認められる。

最後にまとめると、本細胞凝集体形成プレートにより、ラット初代培養肝細胞を用い、コラーゲンなどの細胞外マトリックスの存在しない環境下で、播種細胞に応じた細胞凝集体を得ることができ、また、細胞凝集体の形成と機能の発現に相関があることが確認でき、細胞凝集体の微細構造およびアルブミンの分布状況から、凝集体における機能の発現が一様では無い可能性を示唆する知見を得、またさらに、細胞凝集体はより生体に近い構造およびより分化した状態にあるという知見を得たと言える。

11. 今後の展開

本プレートでのラット肝細胞の細胞凝集体の形成法は、細胞外マトリックスの関与がない培養系での3次元構築のモデルとしては十分な役割を果たすことができると考えられるが、機能を安定し維持させるという意味では十分であるとは言えない。もともと、細胞凝集体の構築の目的はより生体に近い状態での細胞培養を目指し、将来は動物実験代替へつなげるものであり、今後、今回得られた知見を考慮しながら、より生体に近い培養環境の構築を目指し、コラーゲンをはじめとする細胞外マトリックスを導入した3次元培養環境下での、細胞毒性評価方法および条件を探索し、動物実験代替へつなぐための基礎を造りを行う。

12. 参考文献

- (1) 赤池ら、人工臓器 19 (3), 1156-1160 (1990)
- (2) J. LANDRY et al., J. Cell. Biol., 101. 914-923 (1985)
- (3) T. TAKEZAWA et al., BIOTECHNOLOGY. 8. 854-856 (1990)
- (4) 新生物化学実験講座 18. 139-143

13. なし

14.

- (1) Development of the method for formation of spheroid and functional regulation of culture cells.
- (2) Akita Sumitomo Bakelite Co., LTD
- (3) Kenji Kawamura
- (4) Naoko Morita, Kanehisa Yokoyama, Naoki Mastuda
- (5) 1997

(6) Abstract:

We have produced the 96 multi-well culture plate with round bottom wells treated for non-cell-adhesion. In this plate, cells form a spheroid in each well without extra cellular matrix and the size of spheroid is controlled by the number of plating cells.

In this study, we cultured rat hepatocyte which is one of typical functional cells in this plate, and examined the feature of spheroid formation in this plate, relational effect of forming spheroid to cellular function, localization of functioning cells in the spheroid, and ultra structure of the spheroid.

In this plate, rat hepatocyte formed a spheroid in each well without extra cellular matrix and the size of spheroid is controlled by the number of the plated rat hepatocytes. And we confirmed relational effect of forming spheroid to cellular function of rat hepatocyte. And we found the possibility that cellular functioning cells are localizing in surface layer of rat hepatocyte spheroid from the result that albumin is localizing in surface layer cells of rat hepatocyte spheroid. And we confirmed that rat hepatocytes composing spheroid are in the more differentiated phase than monolayer culture.