

## 2 生体内環境モデルとなる培養担体の開発

竹澤俊明\*

### 2.1 はじめに

動物実験代替に有用な3次元培養技術とは具体的にはどのような培養技術であり、また、その技術開発にはどのようなバイオマテリアルが必要となるのであろうか。動物細胞の3次元培養技術は、1970年前後に相次いで開発されたマイクロビーズ担体とホロファイバー（中空糸）担体を利用した大量培養システムに起源を発する<sup>1,2)</sup>。80年前後には、真皮由来線維芽細胞をコラーゲンゲル内に包埋培養して真皮様組織を再構築し、さらに表皮角化細胞を重層培養することで皮膚のオルガノイド（器官様構造体）を創出する3次元培養法が開発された<sup>3,4)</sup>。その後、動物実験代替法の分野では、ナイロンメッシュ担体上に線維芽細胞と表皮角化細胞を3次元培養した簡易型皮膚モデルが化粧品や生活用の化学消耗品に対する安全性評価に使用され始めた<sup>5~7)</sup>。90年代に入ると、生体分解性ポリマーから作製した鋳型担体に細胞を3次元培養することで、臓器の再建を目指す組織工学の学際領域が確立された<sup>8)</sup>。近年は、幹細胞生物学の急速な発展も相俟って、3次元組織を再生する培養技術は再生医療の基盤技術としても著しく展開している<sup>9)</sup>。動物実験代替法の分野では、医薬品開発において重要な薬物のADMET（吸収（adsorption）、分布（distribution）、代謝（metabolism）、排泄（excretion）、および毒性（toxicity））予測を個体に近いレベルで行うために、小腸と肝臓など生体内複数器官の一体型培養モデルが考案された<sup>10,11)</sup>。現在では、動物実験を代替するための培養モデルは、化学製品の開発研究のみならずライフサイエンスの基盤研究でも生体反映型の実験ツールとしての期待が大きい。それらの研究に共通のアプローチは、生体内の細胞挙動を生体外で模倣できるような培養モデルを用いて目的とする細胞の応答を解析することにより、生体内の細胞応答を外挿することである。従って、動物実験代替のためのバイオマテリアルとしては、生体内の細胞挙動を生体外で模倣できるような培養モデルを構築するための担体を開発することが重要となる。

ここでは、生体内の細胞挙動を制御している環境と生体外に於いて生体内の疑似環境を創出する構想について概説すると共に、そのような構想に基づいて最近開発した「組織を薄切した切片担体」と「コラーゲンビトリゲル薄膜担体」について、それら担体を用いた細胞応答解析のアプローチを含めて紹介する。

---

\* Toshiaki Takezawa (独)農業生物資源研究所 遺伝子組換え家畜研究センター 主任研究員

## 2.2 生体内の細胞挙動を制御している環境

生体内の細胞は、血球や腹水がん細胞などの浮遊細胞（接着非依存性細胞）のほかは、細胞外マトリックスに接着して多細胞性の組織を構成している接着依存性細胞である。ここでは、接着依存性細胞の挙動を制御している環境について述べる。個々の接着依存性細胞は、単独あるいは細胞間結合を維持した集団状態で細胞の足場となる細胞外マトリックスに支えられ、また、栄養の供給と老廃物の除去を担う間質液（組織を構成する多細胞間の微小間隙にある細胞外液）により新陳代謝されることで成長している。細胞の成長過程は、未分化の幹細胞のステージに始まり、増殖分化を繰り返して前駆細胞およびコミット細胞のステージを経て、形態的にも機能的にも組織特異性を呈する分化細胞、さらに終末分化細胞のステージへと一連の細胞系譜（cell lineage）に従って徐々に進行していく。生体内の各々の器官では、このような細胞系譜を異にする2種類以上の接着依存性細胞が細胞外マトリックスを足場として秩序正しく集積し、間質液を介してパラクライン的な相互作用を及ぼし合うことによって、特定の生理機能を発揮している。ここで、細胞外マトリックスを構成する固相分子群と間質液を構成する液相分子群は、いずれの組成も生体の器官内で一様ではなく局所に依存して異なる。つまり、生体内細胞の経時的な挙動は、注目した細胞を取り巻く微小環境に依存した固相分子群と液相分子群によって調節されていると解釈できる<sup>9)</sup>。なお、固相分子群は組成のみならず構造も細胞挙動の制御に大きく影響を及ぼしている。

## 2.3 生体外に於いて生体内の疑似環境を創出する構想

生体外の培養系で生体内の疑似環境を創出する基本構想は、間質液の液相分子群の役割を培養液で、また細胞外マトリックスの固相分子群の役割を培養担体で代替することである。具体的には、液相分子群については種々のビタミン、細胞成長因子、ホルモンおよび血清を添加した培養液が用いられてきた。また、パラクライン因子を補給する手段としては、他細胞を培養した馴化培養液で目的とする細胞を培養する方法、薬剤等で処理した他細胞のフィダーレイヤー上で目的とする細胞を共培養する方法、あるいは直接未処理の他細胞と目的とする細胞を共培養する方法が開発されてきた。また、固相分子群については、当初は細胞外マトリックス成分を被覆した培養皿、あるいは細胞外マトリックス成分のゲルを培養担体に用いるアプローチが発達した。1970年代以降は徐々に様々なバイオマテリアルが開発されて、培養担体にも用いられるようになった。特に、硬組織の生体内疑似環境を創出するためにはセラミックスや金属が、また、軟組織のためには生分解性の合成高分子や生体組織の細胞を可溶化除去した無細胞性組織が利用された。これらは、生体内組織の力学的特徴を模倣する概念に基づいて、組織工学的な発想で開発された培養担体である。現在では、細胞の生死、付着形態、接着伸展、増殖、分化、極性表示、移

行浸潤、および自己組織化などの挙動を制御するために、生物素材、人工素材、あるいは両者のハイブリッド素材を様々な形状に加工した種々のバイオマテリアルが開発され、培養担体として利用されるようになった（図1）<sup>12)</sup>。

## 2.4 組織を薄切した切片担体の開発とその担体を用いた細胞応答の解析

上述したように細胞挙動を制御する様々な培養担体が開発されてきたが、生体組織の複雑な構造と成分の双方を反映した培養担体は未開発であった。そこで、組織病理学の分野では染色による形態観察を目的として日常的に作製される「組織を薄切した切片」に着眼した。何故なら、切片には生体組織の微細構造のみならず抗体や核酸プローブで検出されるように様々な生体分子が部域特異的に残存しているので、細胞の培養担体に応用することで切片に介在している部域特異的な微細構造や生体分子に依存したシグナルを培養細胞に伝達できるのではないかと考えた。このような観点から、切片を動物細胞の培養担体に活用する培養新技術を開発し、原著論文では新しい概念で作製した「組織病理学用の組織／器官切片（Tissue/Organ Sections for Histopathology）」担体なのでTOSHI担体と命名した<sup>13)</sup>。

これまでに、切片担体上で培養した細胞の接着、増殖、分化などの挙動は、細胞が同じでも切片に用いた組織に依存して異なること、また切片に用いた組織が同じでも細胞に依存して異なる

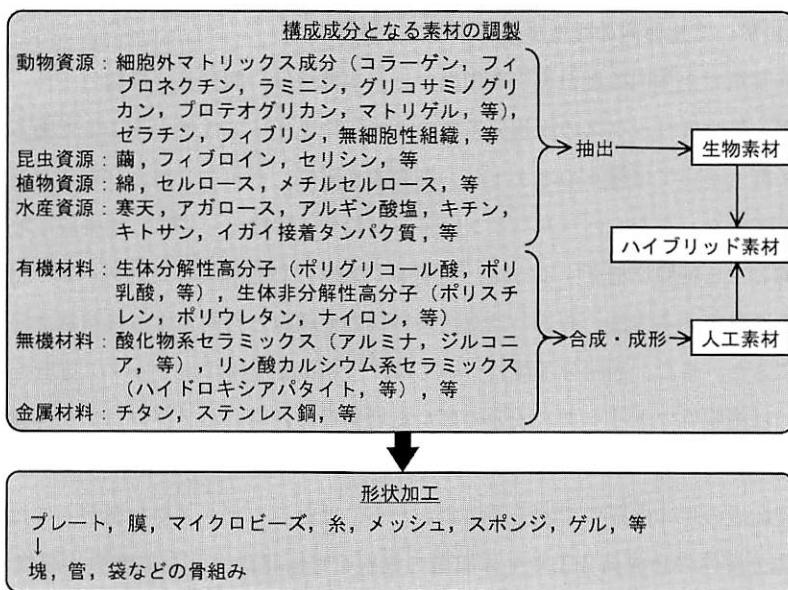


図1 培養担体として利用するバイオマテリアルの開発構想  
(再生医療のための細胞生物学<sup>12)</sup>, p.198, 図10.5を改変)

ことが分かってきた。つまり、切片担体は組織の部域特異的なシグナルを細胞に伝達し、細胞はシグナルを認識するセンサーとして働く（図2）。このことは、組織切片に介在している生体分子（群）が培養細胞の挙動を制御する生物活性物質として作用することを示唆する。従って、1つの組織に由来する切片担体を利用して異なる多数の細胞株を網羅的に解析するセロミクス（cellomics）研究と、1つの細胞株を利用して異なる多数の組織に由来する切片担体を網羅的に解析するヒストミクス（histomics）研究が可能になる。今後、組織切片と細胞の相互作用プロファイルを集積したデータベースが構築できれば、特性を診断したい細胞と特性既知の組織切片または特性を診断したい組織切片と特性既知の細胞を組み合せて培養して得られる細胞挙動プロファイルをデータベースへフィードバックすることで新しい診断システムが創出できると考えている（図3、図4）<sup>14~17)</sup>。

それでは、組織を薄切した切片担体を利用した培養システムは、動物実験代替の視点から具体的にどのようなメリットが考えられるのであろうか。通常用いる切片担体は厚みが5 μmなので、厚み1 cmの組織であれば2,000枚を作製することができる。また、実験動物一個体に化学物質を投与すれば、化学物質の薬効・毒性を反映した切片担体は標的器官のみならず全身の諸器官からも作製することができる。従って、実験動物一個体を有効に活用して多数の切片担体を作製し、切片担体に介在する薬効・毒性を様々な培養細胞の挙動で解析する新しい組織培養システムの構築が期待できる。ひいては特定の化学物質を投与した同じ実験動物に由来する切片担体を、複数の異なる研究機関でバリデーションに利用することも期待できる。さらに、切片担体は

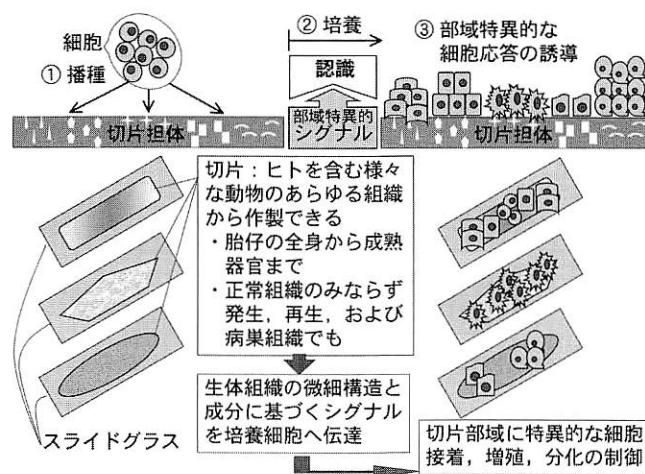


図2 動物組織の切片を培養担体に活用した細胞培養技術の概要  
(再生医療<sup>16)</sup>, p.41, 図1を改変)

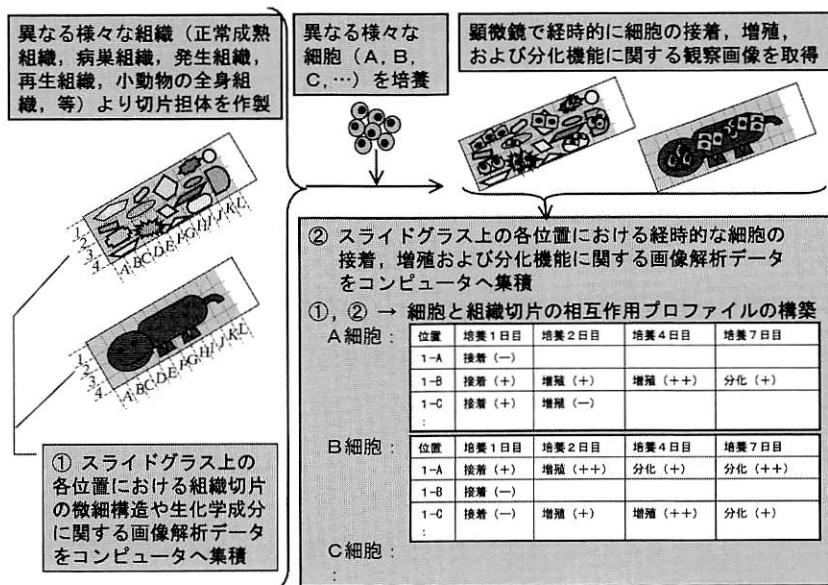


図 3 組織切片と細胞の相互作用プロファイルを構築する構想  
(バイオテクノロジーニューラル<sup>17)</sup>, p.199, 図1を改変)

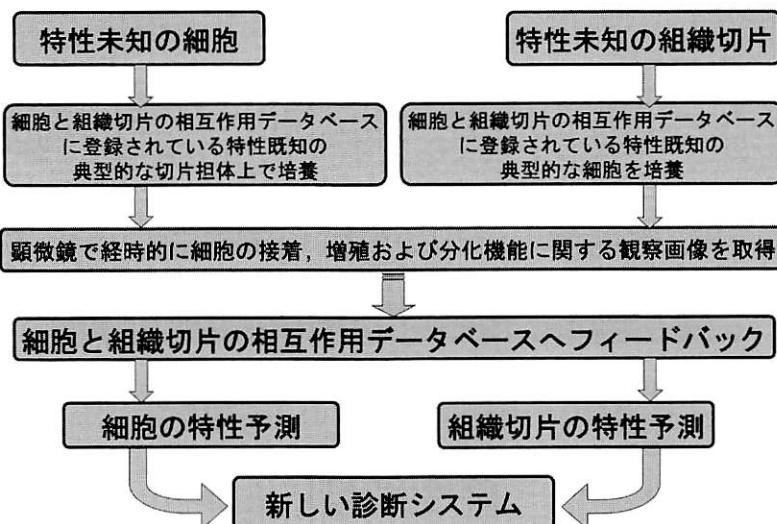


図 4 細胞と組織切片の相互作用データベースを活用した診断システムの開発構想  
(バイオテクノロジーニューラル<sup>17)</sup>, p.200, 図2を改変)

実験動物のみならずヒトの様々な生検材料からも作製できる。つまり、切片担体を利用した薬効・毒性試験モデルは、実験動物の削減、あるいは置き換えの観点から有用な代替法となると考えられる。

## 2.5 コラーゲンビトリゲル薄膜担体の開発とその担体を用いた細胞応答の解析

上述したように生体内の細胞の挙動は、2種類以上の細胞の3次元的なパラクライン相互作用によっても大きく制御されている。しかしながら、動物細胞の培養技術は1種類の細胞による2次元培養系が主流であり、2種類以上の異種細胞を用いた3次元培養系は普及していないのが現状である。その理由は、3次元培養は2次元培養と比較すると培養工程が複雑で操作に熟練を要する、位相差顕微鏡による細胞観察が困難あるいは不可能である、播種した細胞の3次元分布は不均一になり易く再現性に劣る、培養液の交換あるいは共培養する異種細胞の播種に伴う無菌操作が困難であるなど、既存の3次元培養技術には数々の欠点がある為である。従って、これらの問題点を改善すれば、生体内器官モデルとなる3次元培養技術を容易に作製できる<sup>18,19)</sup>。

一方、ゆで卵の白身など熱変性蛋白質は、乾燥により自由水のみならず結合水も徐々に除去することで、強度と透明性に優れたガラス様の物性に変換できることが知られている<sup>20)</sup>。そこで、このガラス化の概念を3次元培養担体として汎用されてきたコラーゲンゲルに応用することを考えた。具体的には、培養皿内にコラーゲンのゾルを注入して生理的な塩濃度、水素イオン濃度、および温度を付与してゲル化(gelation)した後、低温で十分に乾燥してガラス化(vitrification)し、さらに細胞の培養担体として使用するために再水和(rehydration)した。その結果、コラーゲンゲルの物性を強度と透明性に優れた薄膜状のゲル(コラーゲンビトリゲル薄膜と命名)に再現性良く変換する技術の開発に成功した(図5)<sup>18,19)</sup>。なお原著論文では、ハイドロゲルであればコラーゲン以外の成分のゲルでもガラス化した後に再水和することで、ゲルを安定した新しい物性状態に変換することができるので、このガラス化工程を経て作製した新しい物性状態のゲルに対してビトリゲル(vitrigel)という学術用語を設定した<sup>18)</sup>。また、上述のコラーゲンゾルに支持体となる環状ナイロン膜を挿入しておけば、ピンセットで容易に扱える支持体付きコラーゲンビトリゲル薄膜を作製できる。この支持体付きコラーゲンビトリゲル薄膜担体上に細胞を二次元培養した後にピンセットで担体を裏返して、担体の裏面には異種細胞を二次元培養することで、上皮間充織や癌血管などの3次元培養モデルを容易に作製することができる<sup>18,19,21)</sup>。さらに、コラーゲンビトリゲル薄膜担体は高分子タンパク質を透過できるので、担体を介したパラクライン作用により標的細胞の分化を誘導することもできる(図6)<sup>21,22)</sup>。

それでは、コラーゲンビトリゲル薄膜担体を利用した培養システムは、動物実験代替の観点から具体的にどのようなメリットが考えられるのであろうか。支持体付きコラーゲンビトリゲル薄

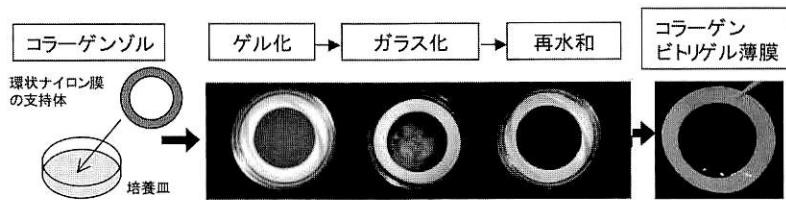


図 5 支持体付コラーゲンビトリゲル薄膜の作製法  
(化学と生物<sup>19)</sup>, p. 714, 図 1 を改変)

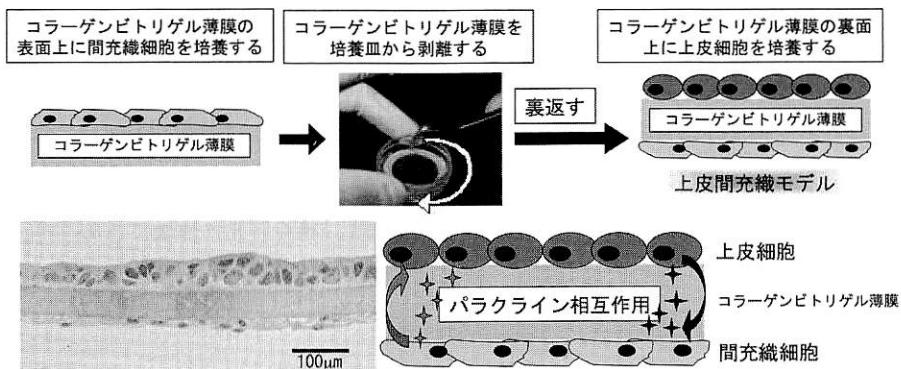


図 6 パラクライン解析に優れた異種細胞間の相互作用モデルの構築  
(化学と生物<sup>19)</sup>, p. 714, 図 1 を改変)

膜担体の両面に細胞を2次元培養すれば、器官の3次元培養モデルを容易に構築できる。この3次元培養モデルはピンセットで簡単に取り扱えるので、保存や輸送に都合がよいだけでなく、バームセルのようなチャンバー（生体膜を装着して薬剤の透過性や代謝を解析する二相性容器）に装着することで細胞極性を考慮した薬物の代謝実験が可能となる。従って、実験動物一個体より大量に得られる肝実質細胞などの初代細胞は、コラーゲンビトリゲル薄膜担体上で培養した状態で複数の異なる研究機関に輸送してバリデーションに利用することも期待できる。また、実験動物由来の細胞を使わずに、ヒトの細胞株を用いて再構築したヒト器官の3次元培養モデルを種々のバリデーションに利用することも可能である。つまり、コラーゲンビトリゲル薄膜担体を利用した薬効・毒性試験モデルも、実験動物の削減、あるいは置き換えの観点から有用な代替法となると考えられる。

## 2.6 おわりに

動物実験代替の目的は、科学研究や教育、化粧品・医薬品や工業製品の生産等に用いる動物実

験について、使用動物数の削減（Reduction）、代替法による置き換え（Replacement）、および動物の苦痛の軽減（Refinement）の3Rを目指すことである。特に、生体内の疑似環境を創出する生体外培養系を用いた薬効・毒性試験モデルは、上述したように実験動物の削減あるいは置き換えに有用な代替法となると考えられる。それゆえ、生体内環境モデルとなる培養担体の開発は、今後ますます発展することが予想される。そのためには、生体内の細胞挙動を制御している環境の役割を様々な視点から捉えることが重要な課題となる。

## 文 献

- 1) A. L. van Wezel, *Nature*, 216, 64 (1967)
- 2) R. A. Knazek *et al.*, *Science*, 178, 65 (1972)
- 3) E. Bell *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 1274 (1979)
- 4) E. Bell *et al.*, *Science*, 211, 1052 (1981)
- 5) G. K. Naughton *et al.*, "Alternative methods in toxicology, vol. 7", p.183, Mary Ann Liebert, Inc. publishers, New York (1989)
- 6) D. Triglia *et al.*, *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, 27 A, 239 (1991)
- 7) S. R. Slivka *et al.*, *J. Invest. Dermatol.*, 100, 40 (1993)
- 8) R. Langer and J. P. Vacanti, *Science*, 260, 920 (1993)
- 9) 岡野光夫, 大和雅之監修, 再生医療技術の最前線, シーエムシー出版, p.33 (2007)
- 10) Y. Sakai *et al.*, *J. Artif. Organs*, 6, 273 (2003)
- 11) S. Choi *et al.*, *Toxicol. In Vitro*, 18, 393 (2004)
- 12) 関口清俊編, 再生医療のための細胞生物学, コロナ社, p.183 (2007)
- 13) T. Takezawa *et al.*, *FASEB J.*, 16, 1847 (2002)
- 14) T. Takezawa *Biomaterials*, 24, 2267 (2003)
- 15) 竹澤俊明, バイオサイエンスとインダストリー, 62, 375 (2004)
- 16) 竹澤俊明, 再生医療, 4, 39 (2005)
- 17) 竹澤俊明, バイオテクノロジージャーナル, 5, 197 (2005)
- 18) T. Takezawa *et al.*, *Cell Transplant.*, 13, 463 (2004)
- 19) 竹澤俊明, 二谷綾, 化学と生物, 42, 713 (2004)
- 20) E. Takushi *et al.*, *Nature*, 345, 298 (1990)
- 21) T. Takezawa *et al.*, *Cells Tissues Organs*, 185, 237 (2007)
- 22) T. Takezawa *et al.*, *J. Biotechnol.*, in press.