

## 成熟ラット肝細胞初代培養におけるSpheroid形成と機能

Formation and Function of Spheroidal Aggregates in Primary Culture of Adult Rat Hepatocytes

鈴木基之\*・酒井康行\*

Motoyuki SUZUKI and Yasuyuki SAKAI

### 1. 緒 言

初代培養肝細胞は、in vivoとほぼ同レベルの肝特異機能を一定期間保持したまま培養可能である。このため肝細胞の大量培養技術の確立には、各種血しょうタンパクや肝特異酵素の大量生産・一時的肝機能代替モジュール・肝シミュレータ等の実現について期待が寄せられている。

初代培養肝細胞のディッシュレベルでの培養では、コラーゲンやファイブロネクチン等の付着伸展因子で被覆した表面上での単層培養(monolayer culture)が一般的である。ところが最近、非伸展性の付着表面において、細胞が次第に集合し球状の高密度凝集体(spheroid)を形成し、単層培養と比較して高機能を長期にわたり発現すること<sup>2)3)4)5)</sup>が報告されており、物質生産の面からも注目を集めている。Spheroidの大量形成・維持法の確立は、在来の単層培養/積層型モジュールの容積を、大幅にコンパクト化する可能性を秘めていると考えられる。

我々は、ポリリジンで被覆したポリスチレンディッシュ上において、既往の報告と同様のものとみられる球状の細胞凝集体(spheroid)を見出した。また、一時的肝機能代替装置や肝シミュレータ等への応用をめざし、肝特異機能の発現・維持について、基礎的な検討を行った。

### 2. 実験方法

#### 2.1 培養表面の調製

表面としては、Falconの組織培養用ポリスチレンディッシュ(35mm)を用いた。ポリリジンコート表面は、Sigma社のpoly-D-lysine(分子量30,000~70,000)を用い、各種濃度のPBS(phosphate buffered saline; pH7.4)でディッシュを37°C, 1h, コーティング後、3mlのPBSで2回洗浄し、使用までPBSを入れて4°Cで保存した。コントロールとして中村らの方法<sup>6)</sup>により調製した

\*東京大学生産技術研究所 第4部

コラーゲン被覆表面を用いた。

#### 2.2 肝細胞の採取と培養

肝細胞は、6~8週齢、200~250gのWisterラットオス(日本生物材料)をネンプタールで麻酔し、0.05%コラゲナーゼ灌流法<sup>7)</sup>により採取した。コラゲナーゼは和光純薬の細胞分散用を用いた。ガーゼろ過・低速遠心・細胞ろ過器(池本理化)によりほぼ実質細胞のみを得た。トリパンブルー染色による生存率は78~83%、収量は1~2×10<sup>6</sup>cellsであった。播種密度正細胞で5.0×10<sup>4</sup>cells/cm<sup>2</sup>、ディッシュ当たり1.5mlの培地量になるように播種した。

培養は、WilliamsのE培地(WE;極東製薬)に20mM HEPES(N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid)、10<sup>-7</sup>Mインスリン(タカラ)、10<sup>-7</sup>M デキサメサゾン(和光純薬)、100units/mlペニシリン(GIBCO)、100μg/mlストレプトマイシン(GIBCO)を添加したものを基本培地として行った。培養開始から6hまでは上記培地で培養した。以降は、基本培地に10<sup>-7</sup>Mグルカゴン(Sigma)と20ng/ml上皮成長因子(EGF;タカラ)を添加した完全培地に換え、培養を続けた。24h後に24回目の培地交換を行い、以下2日ごとに培地交換した。Spheroidについては、5日以降は、50g, 1minで遠心して培地交換を行った。

#### 2.3 細胞凝集体の形成と肝特異機能の測定

Spheroid形成における細胞凝集過程は、位相差顕微鏡下に一定面積内の細胞凝集体および単一細胞の数を経時的に測定することにより間接的に検討した。尿素合成能とグルコース合成能は、基質を同時負荷して測定した。培地を取り除いた後、PBSで2回洗浄、20mM乳酸と5mM塩化アンモニウムを添加したグルコース不含20mM HEPES含有Hanks液(Hanks' balanced salt solution, pH7.2)をディッシュ当たり1.5ml負荷した。細胞凝集体が浮遊し始めてからは(4日以降の測定)、50g, 1minの遠心を利用して、洗浄・基質液への懸濁を行っ

。37°Cで60min培養後、0.5mlをグルコース合成能の測定に、0.5mlを尿素合成量の測定にそれぞれ用いた。グルコース量はグルコースオキシダーゼ/パーオキシダーゼ法<sup>9)</sup>により、尿素量は、ジアセチルモノオキシム法<sup>9)</sup>によりそれぞれ測定した。また、DAPI(4',6-diaminodino-2-phenylindol)蛍光法<sup>10)</sup>によりDNA量を測定し、両機能を規格化して表示した。すなわち、機能測定と同様の洗浄操作を行った後、1.0mlの0.25%トリプシン/0.02% EDTAで37°C、10min処理後、超音波破砕機で細胞を破壊しDAPIと反応させ、日立分光蛍光光度計(650-40)を用い励起光350nmで450nmでの蛍光強度を測定した。標準物質としては、仔牛胸線DNA(Sigma)を用いた。

### 3. 結果および考察

#### 3.1 凝集体形成

ポリリジン上およびコラーゲン上におけるラット肝細胞の形態変化を図1に示す。コラーゲン被覆表面上では、24h後にはほとんど細胞が伸展、互いに結合し、敷石状の細胞層を形成した。ところがポリリジン上では、24h後では隣合った細胞どうしが結合するがコラーゲン上のものほど伸展せず、島状に凝集するのみであった。これらの島状凝集体は、2~4日に急激に球状となり、一部は培養液中に浮遊した。ポリリジン上における凝集過程を定量化した結果を図2に示す。この測定は単一細胞をも含

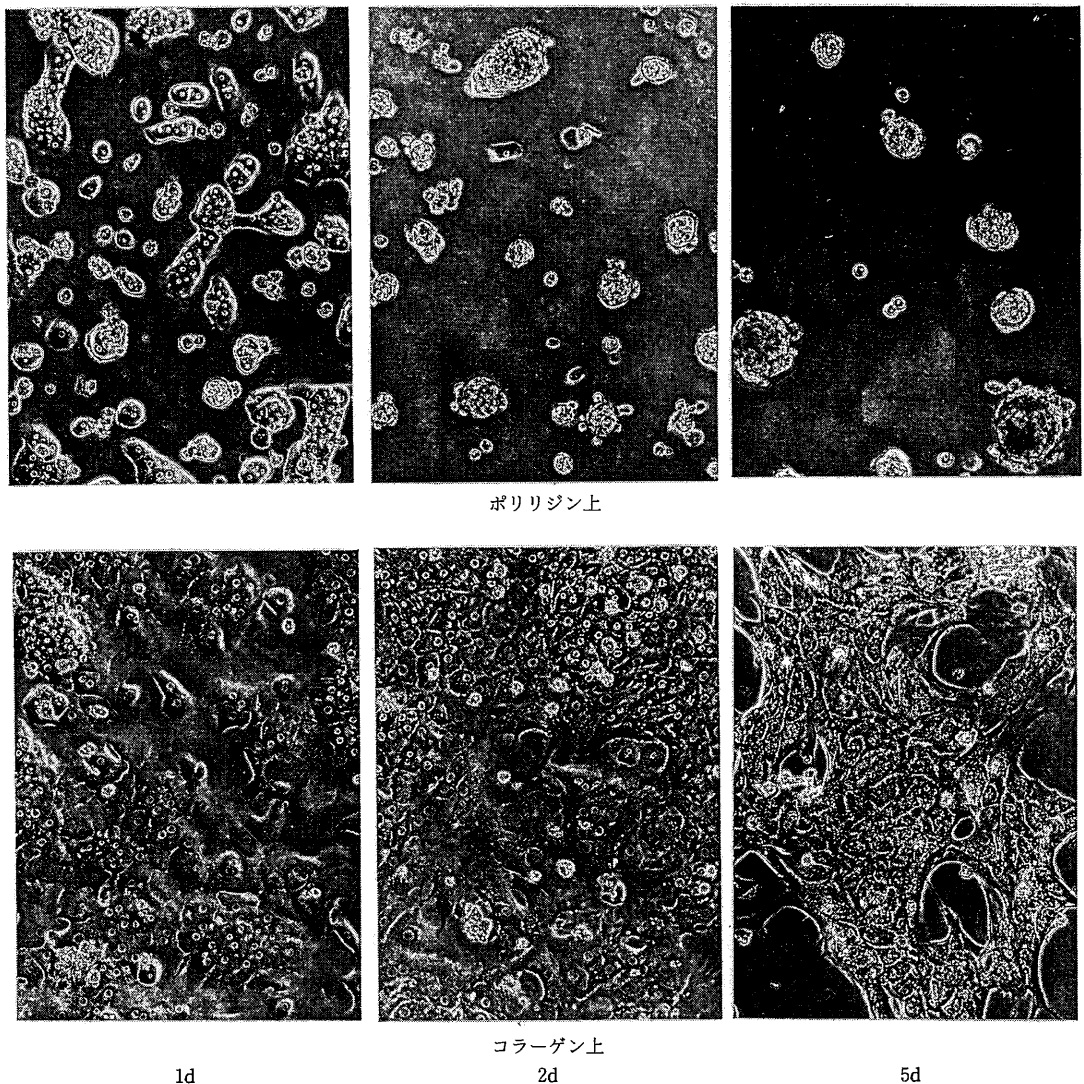


図1 ポリリジン上およびコラーゲン上における肝細胞の形態変化

研究速報

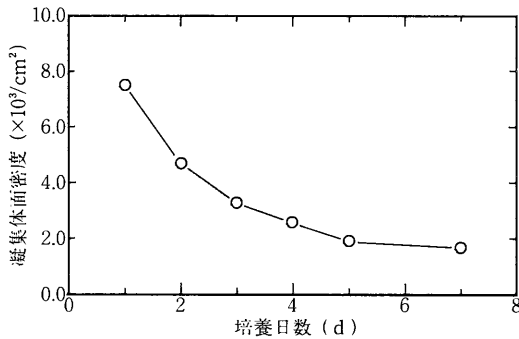


図2 ポリリジン上における細胞凝集過程

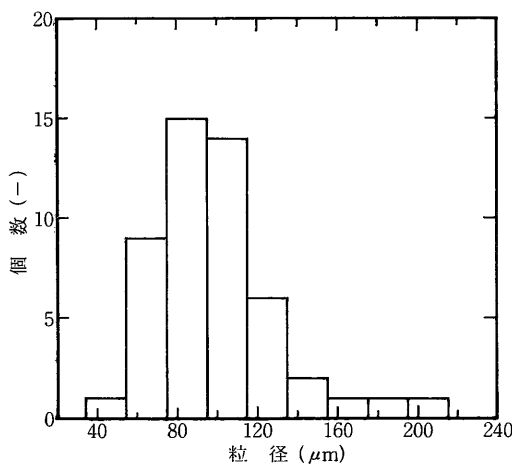


図3 7dにおけるSpheroid粒径分布

め、互いに分離している島状または球状の凝集体の面密度を経時的に測定したものである。Spheroidだけを計測したものではないが、間接的に凝集過程を概観できる。凝集は、1~3日にかけて急激に進行し、5日後にはほぼ平衡に達した。また、7日目におけるspheroidの粒径分布を図3に示す。この時点でのspheroid平均面密度は420個/cm<sup>2</sup>、平均径は98 $\mu\text{m}$ であった。

初代培養肝細胞において、spheroidの形成を初めて報告したのは、Landryら<sup>1)</sup>である。彼らはpoly (2-hydroxyethyl methacrylate)被覆表面において、幼若ラット肝細胞が、播種直後から凝集を開始し、アルブミン分泌・TAT (tyrosine aminotransferase)活性を5~6数週間にわたり維持したと述べている。しかしながら幼若ラット肝細胞は、血清やホルモン等を全く添加しない条件下においても、自己の分泌する増殖因子により、活発に増殖すること<sup>13)</sup>から、成熟ラット肝細胞におけるspheroid形成と同一視することはできないと考えられる。

成熟ラット肝細胞におけるspheroid形成の報告を培養

表面から分類すると、①ラット肝ホモジネート不溶性物質 (Biomatrix<sup>TM</sup>) のプロテオグリカン分画上的のもの<sup>3)4)5)</sup>、②ラクトース側鎖導入ポリスチレン (PVLA) 上のもの<sup>1)</sup>、③Falconのプライマリアディッシュ上のもの<sup>13)</sup>、そして、④本報告のポリリジン上のもの、の4例となる。①については、プロテオグリカンと肝細胞の生物学的な親和性が関与していると考えられるが、詳細はいまだ不明である。②については、肝細胞のアシアロ糖タンパクの取り込み機作を利用して特異的付着を行わしめている<sup>1)</sup>、③については、プライマリアディッシュにはアミノ基やアミド基が導入されていること<sup>14)</sup>より、ポリリジン表面との類似性が考えられる。すなわち、アミノ基または正電荷を持った表面が、spheroidを形成させる一つの表面であると考えられることができる。

3.2 単層培養との機能比較

細胞維持の指標となるDNA量と代表的な肝特異機能として単位DNA量当りに規格化したグルコース合成能および尿素合成能を、ポリリジン上のspheroidとコラーゲン上のmonolayerとで比較した。結果を図4に示す。DNA量でみた細胞の維持は、ポリリジンの方が明らかに

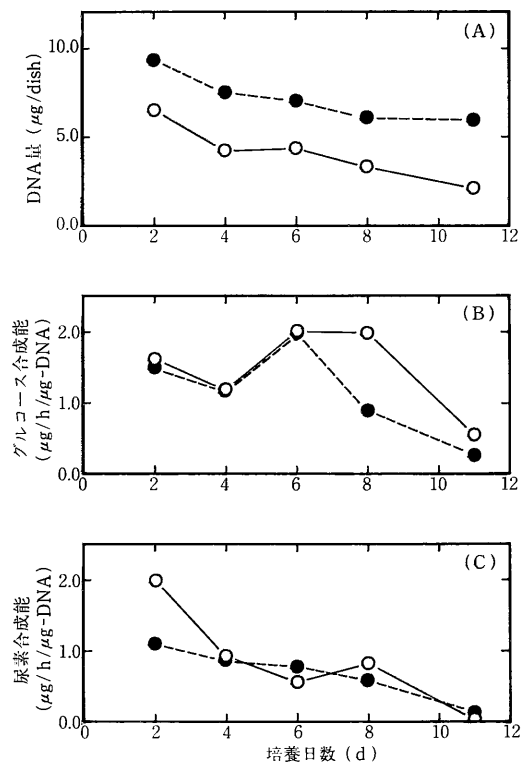


図4 SpheroidとmonoLayerにおける維持と肝特異機能の発現 (○: Spheroid, ●: monoLayer)

研究速報  
 劣っていた。培養初期の培地交換の際には、付着安定性はコラーゲン上の方がポリリジン上より優れていることが容易に観察された。また、単一状態のまま spheroid に組織化されない細胞は、spheroid に組織化された細胞と比較して早く死亡することが、トリパンブルー染色により観察された。培養初期における細胞付着安定性の改善および付着細胞の spheroid への組織化率を向上させることが、ポリリジン上での spheroid 大量生産にとり必要であると考えられる。

また単位 DNA 量あたりのグルコース合成能・尿素合成能は、monolayer より spheroid の方が若干良好であるようだが、大差は見られなかった。両者とも培養 11 日目には、ほぼ機能を失ったが、spheroid 形態的には 13 日まで維持された。Monolayer では測定された DNA 量にあたる細胞すべてが機能発現していると考えられるが、ポリリジン上においては spheroid に組織化されず、機能発現していない細胞も DNA 量に入っている可能性が充分にある。機能発現の優劣を的確に検討するためにも、spheroid への組織化率を向上させる培養条件の確立が必要であろう。

ラット肝 Biomatrix のプロテオグリカン分画面上における spheroid は、2 週間にわたり高濃度のアルブミンを分泌したことが報告されている<sup>9)</sup>。しかしホルモン濃度等が異なり、本実験と一概に比較できない。すなわち WE 培地に、Enat<sup>10)</sup> にならぬ、インスリンを  $10^{-6}$ M オーダーで、EGF を 50ng/ml の高濃度で添加している (本実験はインスリン  $10^{-7}$ M, EGF 20ng/ml)。機能発現・維持について、高濃度のホルモン添加が有効であることも示唆される。

一方、無血清条件下での単層培養では、細胞膜に存在するトリプシン様プロテアーゼによる細胞破壊が起こること、血清中のプロテアーゼインヒビター群やアプロチニンは、この細胞膜プロテアーゼを阻害することにより

細胞生存を促進することが明らかにされている<sup>16)</sup>。われわれも、無血清条件下で形成された spheroid を、血清またはアプロチニン添加培地に移すと、形態的維持が促進されることを観察している (未発表)。Spheroid の維持については、ホルモン濃度ばかりでなくプロテアーゼインヒビター添加の側面からも検討する必要がある。

#### 謝 辞

研究の開始にあたり御指導いただいた、昭和大学薬学部の内海英雄助教および村山純一郎氏に謝意を表します。  
 (1990年8月9日受理)

#### 参 考 文 献

- 1) 赤池ら, 細胞工學8, 219 (1989)
- 2) J. Landry et al., J. cell Biol., 101, 914 (1985)
- 3) N. Koide et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 161, 385 (1989)
- 4) 真治ら, 人工臓器, 17, 179 (1988)
- 5) 川口ら, 人工臓器, 18, 1269 (1989)
- 6) 中村ら, 初代培養肝細胞実験法, P. 38, 学会出版センター (1987)
- 7) 小平ら, 実験医学, 7, 1488 (1989)
- 8) A. Tomomura et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 97, 1276 (1980)
- 9) T. Momose et al., Clin. Chem., 11, 113 (1965)
- 10) C.F. Brunk et al., Anal. Biochem., 92, 497 (1979)
- 11) T. Nakamura et al., Exp. Cell Res., 169, 1 (1987)
- 12) M. Rojkind et al., J. Cell Biol. 87, 255 (1980)
- 13) 田端ら, 第6回初代培養肝細胞研究会抄録, p. 21, 久留米 (1980)
- 14) Becton Dickinson Co., "PRIMARIA manual", p. 4, Becton Dickinson Co. (1990)
- 15) R. Enat et al., proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 1411 (1984)
- 16) T. Nakamura et al., Exp. Cell Res., 155, 81 (1984)