

コラーゲンビトリゲル薄膜の特徴を活用した新しい細胞培養システムの開発

竹澤俊明,^{*,a} 福田真野,^{a,f} Winnette McIntosh-Ambrose,^{a,c} 高知愛,^b
Jennifer Elisseff,^c 芳賀早苗,^d 尾崎倫孝,^d 加藤聖子,^e
王碧昭,^f 内野正,^g 西田輝夫^b

Development of Novel Cell Culture Systems Utilizing the Advantages of Collagen Vitrigel Membrane

Toshiaki TAKEZAWA,^{*,a} Maya FUKUDA,^{a,f} Winnette MCINTOSH-AMBROSE,^{a,c} Ji-Ae KO,^b
Jennifer ELISSEFF,^c Sanae HAGA,^d Michitaka OZAKI,^d Kiyoko KATO,^e
Pi-Chao WANG,^f Tadashi UCHINO,^g and Teruo NISHIDA^b

^aTransgenic Animal Research Center, National Institute of Agrobiological Sciences, 2 Ikenodai, Tsukuba, Ibaraki 305-0901, Japan, ^bOphthalmology, Yamaguchi University Graduate School of Medicine, 1-1-1 Minami-kogushi, Ube, Yamaguchi 755-8505, Japan, ^cDepartment of Biomedical Engineering, Johns Hopkins University, 3400 N. Charles Street, Baltimore, Maryland 21218, USA, ^dDepartment of Molecular Surgery, Hokkaido University School of Medicine, N-15, W-7, Kita-ku, Sapporo, Hokkaido 060-8638, Japan, ^eDivision of Molecular and Cell Therapeutics, Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University, 3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582, Japan, ^fGraduate School of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba, 1-1-1 Tennodai, Tsukuba, Ibaraki 305-8572, Japan, and ^gDivision of Environmental Chemistry, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

(Received October 1, 2009)

The white of an egg, rendered opaque by boiling, can be converted into a thin, transparent and rigid material like glass by evaporating the moisture. This phenomenon is known as the vitrification of heat-denatured proteins. We applied vitrification technology to a collagen gel and converted it into a rigid glass-like material. We attempted to rehydrate the glass-like material and succeeded in preparing a novel stable state of collagen gel that was a thin and transparent membrane with excellent gel strength and protein permeability. We called it “collagen vitrigel” because it was produced from the vitrification process of a traditional hydrogel. Further, a framework-embedded collagen vitrigel membrane that can be easily turned inside out with tweezers was prepared by inserting a nylon membrane ring in the collagen sol prior to the gelation, thereby allowing the membrane to function as a removable cell culture substratum. Different types of anchorage-dependent cells could be cultured on both surfaces of the substratum by the manipulation of two-dimensional cultures, and consequently a three-dimensional crosstalk model with paracrine effects from each cell type was reconstructed. Also, the collagen vitrigel membrane containing a bioactive molecule provided a drug delivery system (DDS) with sustainable release. In this review, we summarize the recent progress of applied studies using the collagen vitrigel membrane as follows: a corneal model for eye irritant and permeability tests, a skin model for sensitization test, a renal glomerular model for evaluating blood filtration, an endometrial model for developing a new treatment and a DDS of hepatocyte growth factor for improving liver disorder.

Key words—collagen; vitrigel; three-dimensional culture; paracrine; drug delivery system (DDS)

^a農業生物資源研究所遺伝子組換え家畜研究センター (〒305-0901 茨城県つくば市池の台2), ^b山口大学大学院医学系研究科眼科学 (〒755-8505 山口県宇部市南小串1-1-1), ^cDepartment of Biomedical Engineering, Johns Hopkins University (3400 N. Charles Street, Baltimore, Maryland 21218, USA.), ^d北海道大学大学院医学研究科分子制御外科学講座 (〒060-8638 北海道札幌市北区北15条西7丁目), ^e九州大学生体防御医学研究所ゲノム創薬・治療学分野 (〒812-8582 福岡県福岡市東区馬出3-1-1), ^f筑波大学大学院生命環境科学研究科 (〒305-8572 茨城県つくば市天王台1-1-1), ^g国立医薬品食品衛生研究所環境衛生化学部 (〒158-8501 東京都世田谷区上用賀1-18-1)

*e-mail: t.takezawa@affrc.go.jp

本総説は、日本薬学会第129年会シンポジウムS24で発表したものを中心に記述したものである。

1. はじめに

創薬の研究には、様々な機能細胞を用いて生体を反映した3次元培養モデルを簡便に構築できる培養システムの開発が長く求められてきた。特にコラーゲンを細胞の培養担体に用いる3次元培養技術は、血管新生モデル^{1,2)} がん浸潤モデル^{2,3)} あるいは皮膚などの上皮間充織モデル⁴⁾を再構築するのに有用であるが、幅広く普及するには至っていなかった。その理由としては、従来のコラーゲンは低密度のコラーゲン線維で構成されるため柔らかく、また不透明であるため培養細胞の位相差顕微鏡観察はかならずしも容易ではないことなど培養担体としての取扱いに困難を伴っていたことが考えられる。

そこで注目したのが、ゆで卵の白身など熱変性タンパク質のゲルは、乾燥して自由水のみならず結合水も徐々に除去すると、硬くて透明なガラス様の物質に変換できるという報告である。⁵⁾ この熱変性タンパク質のガラス化技術を従来のコラーゲンゲルに応用した後に再水和することで、生体内の結合組織に匹敵する高密度のコラーゲン線維で形成されるゲルを世界に先駆けて作製することに成功した。この高密度のコラーゲン線維のゲルはガラス化 (vitrification) 工程を経て作製できるので、コラーゲンビトリゲル (vitrigel) と命名した。つまり、コラーゲンビトリゲルは以下の3段階の工程を経て作製できる。まず、コラーゲンゾルに生理的な塩濃度、水素イオン濃度、及び温度を付与することでゲル化する。次に、ゲル化したコラーゲンゲル内の自由水を除去した後に、結合水も徐々に除去してガラス化する。さらに、ガラス化した乾燥コラーゲンを再水和することにより、コラーゲンビトリゲルは作製できる。⁶⁾ なお、この作製工程でコラーゲンゾルをゲル化してコラーゲンを調製する際に用いる容器の形状を工夫することで、薄膜状のみならず糸状や管状など様々な形状のコラーゲンビトリゲルを作製することが可能となる。

本稿では、コラーゲンビトリゲル薄膜の特徴、眼刺激性及び透過性試験を目指して開発している角膜細胞の培養システム、皮膚感作性試験を目指して開発している皮膚細胞の培養システム、血漿成分の濾過モデルを目指して開発している腎糸球体細胞の培養システム、不妊症の新規治療法を目指して開発している子宮内膜細胞の培養システム、肝障害の改善

を目指して開発している薬物送達システム、及び創薬支援ツールとしての展開構想について述べる。

2. コラーゲンビトリゲル薄膜の特徴^{7,8)}

コラーゲンビトリゲル薄膜は水平な底面の容器内にコラーゲンゾルを注入して、ゲル化、ガラス化及び再水和することで作製できる。コラーゲンビトリゲル薄膜の厚さは、注入するコラーゲン量及びガラス化の期間に依存する。例えば、底面積1 cm² 当たり0.5 mgのコラーゲンを含有するゾルを0.2 ml注入してゲル化させた厚さ約2 mmの0.25% (w/v) コラーゲンを2週間以上にわたりガラス化した後に再水和した場合には、厚さ約15–20 μmの透明なコラーゲンビトリゲル薄膜に変換できる。⁹⁾ この過程で、表面形状は変わらないことから体積は100–133分の1程度になっていることが分かる。つまり、コラーゲンビトリゲル薄膜ではコラーゲン線維密度が当初のコラーゲンの約100–133倍に相当する25–33%程度になるので、生体内結合組織のコラーゲン線維密度にほぼ匹敵すると解釈できる。¹⁰⁾ また、コラーゲンビトリゲル薄膜の走査電子顕微鏡の観察では、およそ67 nmの明瞭な縞模様を呈する細線維が配向することなく高い密度でランダムに重なり合っていることが確認できた。¹¹⁾

また、上述の作製工程でコラーゲンゾルを注入する容器に培養皿を利用して、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。その結果、コラーゲンビトリゲル薄膜の円形状形態を維持したまま移動して強度測定器やパームセル (生体膜を装着して薬剤の透過性や代謝を解析する2相性容器) 等の固定台への装着が可能となる。コラーゲンビトリゲル薄膜の圧力に対する破断強度測定では、ガラス化の期間が増すほど強くなる傾向を示し、約3ヵ月間にわたりガラス化した場合は従来のコラーゲンの15倍以上の強度となった。⁶⁾



竹澤俊明

独立行政法人農業生物資源研究所上級研究員。1986年東京薬科大学薬学部卒業。1993年博士 (薬学) 学位取得 (千葉大学)。動物細胞の足場に注目した基盤研究から細胞挙動を制御する技術を開発して、創薬、再生医学あるいは動物実験代替法への応用を目指した生体機能再生薬学及び組織再生医学に関する研究を展開。

パームセルを用いた血清タンパク質の透過実験では、コラーゲンビトリゲル薄膜は分子量 100 kDa 以上の高分子血清タンパク質も透過することが分かった。⁹⁾

したがって、コラーゲンビトリゲル薄膜の特徴は生体内の結合組織に匹敵する高密度のコラーゲン線維が互いに絡み合った厚さ数十マイクロメートルの透明な膜であり、優れたタンパク質透過性及び強度を有していることである。また、コラーゲンゾルには様々な不溶性物質あるいは可溶性物質を添加できるので、添加した物質の特性をコラーゲンビトリゲルに反映できる。例えば、環状ナイロン膜支持体を包埋したコラーゲンビトリゲル薄膜はピンセットで容易に取り扱えるので [Fig. 1(A)], 動物細胞の培養担体あるいは生体適合性の移植素材としての利便性を向上できる。この培養担体を使用すれば 2 次元培養の技術で担体の両面に細胞を培養できるので、結果として異種細胞間のパラクライン解析に有用な上皮間充織などの生体を反映した 3 次元培養モデルを容易に再構築できることとなる [Fig. 1(B)]. なお、環状ナイロン膜支持体付きコラーゲンビトリゲル薄膜の培養担体は既に製品化されている。現在、後述のような様々な細胞培養システムの開発に取り組んでいる。また、平面状の繭糸構造体（平面絹）を包埋したコラーゲンビトリゲル薄膜は絹の強度を保持した培養担体として使用できることが分かり、線維芽細胞の 3 次元培養担体として利用することで強度に優れた結合組織の再構築に成功した。¹²⁾ さらに、コラーゲンゾルには不溶性物質のみならず様々な可溶性物質も添加することができる。例えば、コラーゲンゾルに可溶性物質の血管内皮増殖因子 (VEGF; vascular endothelial growth factor) を混和して作製したコラーゲンビトリゲル薄膜には、VEGF を徐放する活性が認められた。そこで、この VEGF 徐放性コラーゲンビトリゲル薄膜をラットの皮下に移植したところ、周囲組織に毛細血管の新生が誘導されることが分かった。¹¹⁾ したがって、生理活性分子を混和して作製したコラーゲンビトリゲル薄膜は薬物送達システム (DDS; drug delivery system) として活用できることが示唆された [Fig. 1(C)]. 現在、後述のような DDS の開発に取り組んでいる。

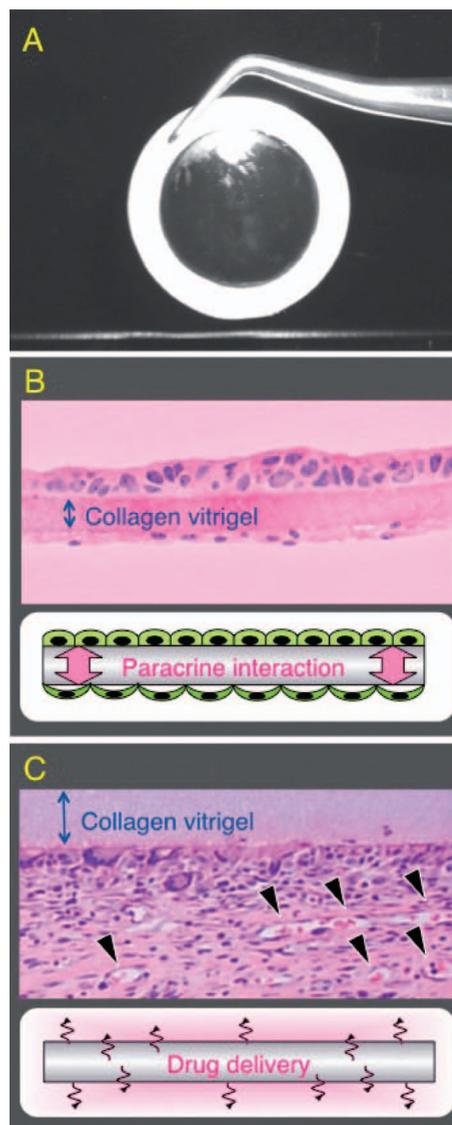


Fig. 1. Advantages of a Collagen Vitrigel Membrane

(A) A nylon membrane ring-embedded collagen vitrigel membrane is readily removable with tweezers. (B) Different types of anchorage-dependent cells can be cultured on the both surfaces of the collagen vitrigel membrane by the manipulation of two-dimensional cultures, resulting in the reconstruction of a three-dimensional crosstalk model with paracrine effect. (C) The collagen vitrigel membrane containing bioactive molecule(s) provides a drug delivery system. Remarkable angiogenesis (arrow heads) was induced by the transplantation of the collagen vitrigel membrane containing vascular endothelial growth factor (VEGF).

3. 眼刺激性及び透過性試験を目指して開発している角膜細胞の培養システム

ウサギを用いた眼刺激性試験（ドレイズ試験）の代替法として、これまでに数多くの *in vitro* 試験法が開発されてきた。¹³⁾ しかし、2次元平面に単層培養した正常ウサギ角膜上皮 (NRCE; normal rabbit corneal epithelial) 細胞に対する化学物質の毒性を生細胞のニュートラルレッド取り込み活性で評価す

る試験法のようにドレイズ試験と相関性の高い方法もあるが、すべての被験物質についてドレイズ試験を完全に代替できる方法はない。また、点眼剤の開発研究では、点眼された薬物が主として結膜嚢内より角膜細胞内に拡散してから眼内へ移行することから、点眼剤成分の角膜透過性及び毒性試験は極めて重要である。これまでに様々な角膜由来細胞を透過膜上に培養したモデルが開発されてきたが、生体の角膜に匹敵する経上皮電気抵抗 (TEER; transepithelial electrical resistance) を有するレベルには至っていない。¹⁴⁾ つまり、従来の培養角膜モデルでは上皮細胞間の Tight-Junction 構造に依存したバリア機能を十分に再構築できていない。それゆえ、点眼剤に用いる化学物質の透過性及び毒性試験ではウサギ等の摘出角膜が使用されているのが現状である。¹⁵⁾

そこで、上述のような問題点を克服できる培養角膜モデルの創出を目指して、コラーゲンビトリゲル薄膜を角膜実質に存在する高密度コラーゲン線維の代替として角膜構成細胞 (上皮細胞, 実質細胞及び内皮細胞) の培養担体に利用する研究を展開している。研究のアプローチとしては、①上皮細胞, 実質細胞あるいは内皮細胞のみの 1 種細胞からなるモデル, ②上皮細胞と実質細胞の 2 種細胞からなるモデル, 及び③上皮細胞と実質細胞と内皮細胞の 3 種細胞からなるモデルを順次構築していくこと、さらに、モデル構築に使用する細胞は初代培養由来の細胞から容易に入手できる細胞株へ置き換えていくこ

とを重視して展開している。

これまでに、NRCE 細胞はプラスチック培養皿で培養した場合と同様に、コラーゲンビトリゲル薄膜担体上でも良好に成長して、敷石状の形態を呈した細胞が単層を形成することが分かった (Fig. 2)。また、コラーゲンビトリゲル薄膜上で NRCE 細胞は角膜上皮特異的なサイトケラチン (K3/12) とギャップ結合タンパク質であるコネキシン (Cx43) の発現が確認されたことから、角膜上皮の表現型を維持していることが示唆された。さらに、初代培養由来のヒト角膜上皮細胞, ウシ角膜実質細胞及びウサギ角膜内皮細胞についてもコラーゲンビトリゲル薄膜担体上では良好に成長して、組織特異的な機能と形態を発現維持することが明らかとなった。¹⁶⁾ 上述の結果は、コラーゲンビトリゲル薄膜が角膜構成細胞に適した培養担体であることを示唆する。

また、角膜の上皮細胞と実質細胞の 2 種細胞からなる培養モデルを構築して相互作用を調べるために、コラーゲンビトリゲル薄膜を介した両細胞の共培養システムを確立した。この研究では、SV40 で形質転換したヒト角膜上皮細胞株 (HCE-T 細胞) と初代培養由来のヒト角膜実質細胞を用いた。その結果、角膜実質細胞の存在は角膜上皮細胞の主たる生理機能であるバリア機能に関与する ZO-1, occludin 及び claudin の発現を亢進することを見い出した。¹⁷⁾ 逆に、角膜上皮細胞の存在は角膜実質細胞の情報伝達に重要であるギャップ結合タンパク質であるコネキシン (Cx43) の発現を亢進した。¹⁸⁾

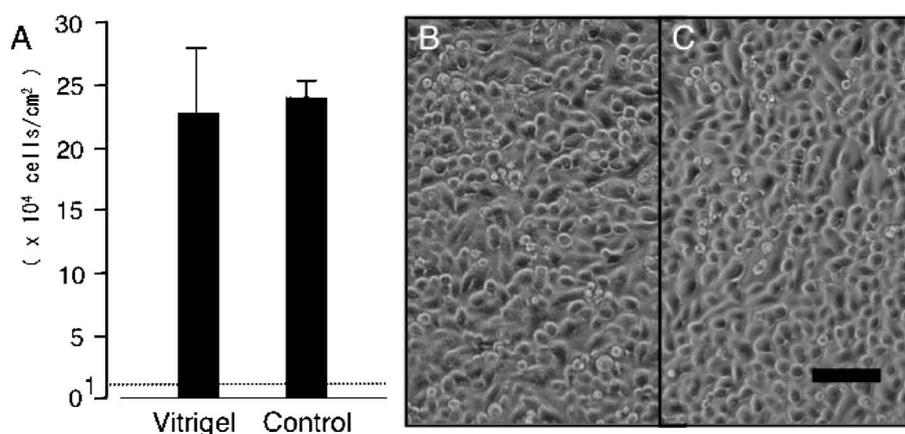


Fig. 2. Growth and Morphology of Normal Rabbit Corneal Epithelial (NRCE) Cells

(A) The number of NRCE cells was measured on day 5 after seeding the cells on collagen vitrigel membrane and control plastic substrata at an initial cell density of 1.0×10^4 cells/cm². The cells cultured for 5 days on collagen vitrigel membrane (B) and control plastic (C) substrata were observed by a phase-contrast microscope. Bar represents 100 μ m.

さらに、ポリジメチルシロキサン (PDMS) にコラーゲンビトリゲル薄膜を挟んだマイクロ流路培養システムを確立して、蛍光色素が上方の角膜上皮細胞側から下方の角膜実質細胞側に経上皮透過性 (TEP; transepithelial permeability) に応じて流出する評価系を開発した。¹⁹⁾ 今後、眼刺激性物質の投与によって変化する経上皮透過性を解析するための有用な手段になると考えている。

なお、本研究で行ったヒト細胞の初代培養実験は、「ヘルシンキ宣言」の倫理基準に従い、山口大学及びジョンホプキンス大学の倫理委員会の承認を得て実施した。また、動物実験は、ジョンホプキンス大学動物実験委員会の審査及び承認を得た後、同大学のガイドラインに従って実施した。さらに、NRCE 細胞は倉敷紡績株式会社より購入した。

4. 皮膚感作性試験を目指して開発している皮膚細胞の培養システム

皮膚感作性物質とは、皮膚への接触によりアレルギー反応を誘発する物質のことである。このような皮膚感作性物質が皮膚に暴露されると、表皮角化細胞から IL-1 α や IL-4 などのサイトカインが分泌されて樹状細胞が活性化され、樹状細胞の膜表面に存在する抗原の CD86 が発現する。このように活性化した樹状細胞は遊走して、T 細胞に抗原を提示する。その結果、T 細胞から IL-2 や IL-4 などのサイトカインが分泌されて皮膚感作性が誘導される。この過程では、活性化した樹状細胞は IL-4 などのサイトカインを分泌して線維芽細胞を活性化するので、線維芽細胞は IL-1 α を分泌して T 細胞を一層活性化することになる。²⁰⁾

上述のような *in vivo* の皮膚感作性を外挿する *in vitro* 試験法の確立を目指して、皮膚に用いる化粧品や医薬部外品などの成分を暴露できる 3 次元培養ヒト皮膚モデルでも特に樹状細胞等の免疫担当細胞を含むモデルの開発が切望されていた。このような背景から、角化細胞と線維芽細胞のみならず樹状細胞も含む 3 次元培養ヒト皮膚モデル (KDF-skin) が開発された。²¹⁾ しかし、このモデルの構築には、①約 3 週間にわたる長い時間が必要である、②角化細胞に正常細胞を用いていないために角層化が不十分である、③使用細胞数が多い、などの問題点があった。

そこで、これらの問題点を解決して皮膚感作性物

質の試験法を確立することを目標に、3 次元培養担体として取扱いが容易なコラーゲンビトリゲル薄膜を培養担体に用いた 3 次元培養ヒト皮膚モデル (VG-KDF-skin) を開発した。²²⁾ 具体的には、コラーゲンビトリゲル薄膜に正常ヒト線維芽細胞を播種して 2-4 時間培養した後に、コラーゲンビトリゲル薄膜を反転させてガラスリングを乗せ、コラーゲンゾルに懸濁した正常ヒト樹状細胞をリング内に播種して 2-4 時間培養することでコラーゲンをゲル化した。その後、リング内のコラーゲンゲル上に正常ヒト角化細胞を播種して 48 時間培養後、表面を空気に曝して 13 日間培養することで角化を誘導した。このようにして皮膚モデルの構築に必要な培養期間を 7 日間に短縮するとともに、使用する線維芽細胞の数を 4 分の 1 に減少することができた。この 3 次元培養ヒト皮膚モデル (VG-KDF-skin) の表面に皮膚感作性物質及び非感作性物質を 1 時間暴露した後、サイトカイン放出量及び CD86 の発現について解析した (Table 1)。まず、皮膚感作性物質及び非感作性物質について分子量との相関性はみられなかった。次に、*in vivo* 皮膚感作性試験法である局所リンパ節試験 (LLNA; local lymph node assay) の結果との相関性については、IL-4 放出量は 92% (11/12)、CD86 発現は 83% (10/12)、IL-1 α 放出量は 64% (7/11) の割合で一致することが明らかとなった。このように 3 次元培養ヒト皮膚モデル (VG-KDF-skin) では IL-4 放出量あるいは CD86 の発現を指標とすると、*in vivo* 試験法との間に高い相関性がみられたことから、今後、皮膚感作性の動物実験代替法としてバリデーションを進められる可能性が示唆された。

なお、本研究で使用した正常ヒト線維芽細胞は理化学研究所バイオリソースセンター、正常ヒト樹状細胞は Cambrex Co. (USA)、及び正常ヒト角化細胞は倉敷紡績株式会社より購入した。

5. 血漿成分の濾過モデルを目指して開発している腎糸球体細胞の培養システム

腎糸球体は基底膜を介して血液濾過することが知られているが、近年、血液の濾過は基底膜だけではなく、糸球体細胞も血液濾過を制御することが注目されている。しかし、糸球体の構成細胞が血液濾過を制御しているメカニズムについては、適切な評価系が確立されていないので解析が困難であった。

Table 1. Effect of Sensitizers and Non-sensitizers on CD86 Expression and Cytokines Release in a Three-dimensional Human Skin Model Using a Collagen Vitrigel Membrane (VG-KDF-Skin)

	Molecular weight	CD86 expression	IL-1 α release	IL-4 release	LLNA
Cinnamaldehyde	132	+	+	+	+
CoCl ₂	130	+	-	+	+
DNCB	203	+	+	+	+
DNFB	186	+	+	+	+
HCA	216	+	+	+	+
HCHO	30	+	-	+	+
Isoeugenol	164	-	+	-	+
Glutaraldehyde	100	-	-	+	+
DMSO	100	-	-	-	-
Isopropanol	60	-	-	-	-
SDS	289	-	+	-	false positive
Tween 80	1798	-	+	-	-

Plus and minus signs in the column for CD86 expression represent increase and decrease in comparison to control, respectively. Plus and minus signs in the columns for IL-1 α and IL-4 indicate increase more than 150% level of control and values less than it, respectively. The data in the LLNA (local lymph node assay) column were cited from the references.²³⁻²⁶⁾

そこで、高分子タンパク質の透過性にも優れたコラーゲンビトリゲル薄膜を糸球体構成細胞の培養担体に利用して、腎糸球体が血液を濾過する方向を反映した培養モデルを構築した。具体的には、ブタ腎臓から単離した糸球体より初代培養した足突起細胞由来の上皮細胞、メサンギウム細胞及び内皮細胞をコラーゲンビトリゲル薄膜担体上で各々コンフルエントまで培養した後、あらかじめ無血清培養液を注いである下方チャンバー上にコラーゲンビトリゲル薄膜を覆い被せた。この際、上皮細胞のモデルでは細胞が無血清培養液に触れるように、またメサンギウム細胞及び内皮細胞のモデルではコラーゲンビトリゲル薄膜が無血清培養液に触れるように設置した。そして、各培養モデルの上方より血清を添加して経時的に下方チャンバー内に透過した血清タンパク質を定性及び定量解析することで、各細胞による血清濾過の制御を評価した。

その結果、メサンギウム細胞及び内皮細胞のモデルでは、細胞を培養していないコラーゲンビトリゲル薄膜（コントロール）と同様に分子量の異なる多種類のタンパク質を透過した。しかし、上皮細胞のモデルでは、およそ 80 kDa 以上のタンパク質の濾過を制御することが分かった。また、透過したタンパク量については、メサンギウム細胞及び内皮細胞

のモデルではコントロールと比較して顕著な濾過制御を認めなかったが、上皮細胞のモデルではコントロールの 6 分の 1 程度に濾過抑制されることが分かった。各モデルの位相差顕微鏡観察では、上皮細胞は他の細胞より細胞間の接着が顕著であることが分かり、濾過制御と細胞間相互作用の関連性が示唆された (Fig. 3)。なお、コラーゲンビトリゲル薄膜を利用して既に確立した上皮細胞とメサンギウム細胞の共培養システムを応用することで、²⁷⁾ より腎糸球体に類似した培養モデルの開発を進めている。今後は、そのような培養モデルを利用して、血清タンパク質の濾過制御と細胞間相互作用の関連性を究明したいと考えている。

なお、本研究で使用した正常ブタ腎糸球体細胞は、土浦市肉食共同組合から購入したブタ腎臓から単離培養したものである。また、本研究で行った動物実験は、筑波大学動物実験委員会の審査及び承認を得た後、同大学の動物実験規定及び文部科学省の策定したガイドラインに従って実施した。

6. 不妊症の新規治療法を目指して開発している子宮内膜細胞の培養システム

子宮内膜は、卵巣から分泌されるエストロゲン、プロゲステロンの作用により増殖、分化（脱落脱化）、月経の変化を周期的に繰り返している。子宮

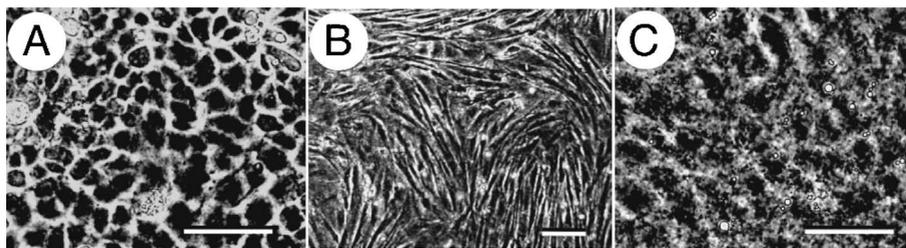


Fig. 3. Cell Morphology of Porcine Renal Glomerular Cells Cultured on Collagen Vitrigel Membrane Substrata at the Confluent Stage

Epithelial cells derived from podocytes (A), mesangial cells (B) and endothelial cells (C) were observed by a phase-contrast microscope. Bars represent 100 μm .

内膜が関与する婦人科的疾患は、様々なものがある。受精卵が子宮内膜に着床するためには、機能的に成熟し、脱落膜化した子宮内膜とそこから分泌される因子が必要であると言われているが、この機能が障害されると着床不全となり不妊症の原因となる。また、子宮内膜が子宮内腔以外の部位に増殖すると子宮内膜症を発症する。プロゲステロンに比しエストロゲンの刺激が過剰になると、子宮内膜は無秩序に増殖し、増殖症を経て子宮体がんを発生する。最近の研究により、これらの原因となるホルモン、サイトカイン、増殖因子、がん遺伝子等が明らかになりつつあるが、これらの因子が直接子宮内膜に起こしている形態学的変化や細胞特性を *in vitro* で観察することは困難である。現在、これらの疾患の発症機序の解明と治療法の開発のため、3次元培養子宮内膜モデルを樹立することに取り組んでいる。子宮内膜が正常に機能するためには、上皮細胞と間質細胞の相互作用が重要であると言われている。そこで、パラクライン作用が評価できるコラーゲンビトリゲル薄膜を用いて3次元培養を試みている。

同意を得た患者から採取した子宮内膜を上皮細胞と間質細胞に分離培養し、まず、間質細胞をコラーゲンビトリゲル薄膜に播種する。3日間培養後にコラーゲンビトリゲル薄膜を反転させ、上皮細胞を播種した。上皮細胞を播種してから7日目に位相差顕微鏡で観察すると、コラーゲンビトリゲル薄膜の上層はところどころに腺管様構造を持つ敷石状に並んだ細胞、また下層は紡錘形の細胞がそれぞれ増殖していた [Figs. 4(A) and (B)]。ホルマリン固定した後にヘマトキシリン・エオシン染色して観察すると、上層には立方上皮が、下層には紡錘形の細胞が増殖しており子宮内膜類似の構造を示していた

[Fig. 4(C)]。現在、様々な因子で刺激に対する細胞特性の変化（形態学的変化、増殖能、発現タンパク等）を解析している。

なお、本研究で行ったヒト細胞の初代培養実験は、「ヘルシンキ宣言」の倫理基準に従い、九州大学倫理委員会の承認を得て実施した。

7. 肝障害の改善を目指して開発している薬物送達システム

コラーゲンビトリゲル薄膜は新しい生体材料として治療への応用が期待できる。特に、外科領域では癒着防止膜としての応用も可能であるが、含有させた薬剤を用途に応じて局所に徐放する DDS による新しい治療も可能であると考えた。局所に対して有効に薬剤を投与することができれば、全身投与による副作用を抑えることができ、また経済的な治療法となり得る。そこで、コラーゲンビトリゲル薄膜を用いた DDS の効果を検証する目的で、肝細胞成長因子 (HGF; hepatocyte growth factor) を含有させたコラーゲンビトリゲル薄膜を作製し、マウス肝虚血時に肝表面を覆い被せることで、再灌流後の肝組織障害の程度が軽減されるか否かを評価した。

具体的には、マウスに吸入麻酔を施した後に開腹し、肝中葉及び左葉への血管をクリップにて挟むことにより肝全体の約 70% を虚血状態とした。60 分間の肝虚血の後、クリップを外すことにより血液を再灌流させた。コラーゲンビトリゲル薄膜は、HGF を含んでいない膜 (コントロール群) と HGF を含む膜 (HGF 群) を作製し、それぞれ肝臓の虚血と同時に肝表面を覆い被せた。マウスは再灌流 24 時間後に犠牲死させ、血液及び肝組織をサンプリングして生化学的及び免疫組織学的に解析した。

その結果、コントロール群では肝組織に広範囲のネクローシスを誘発したが [Figs. 5(A) and (B)]、

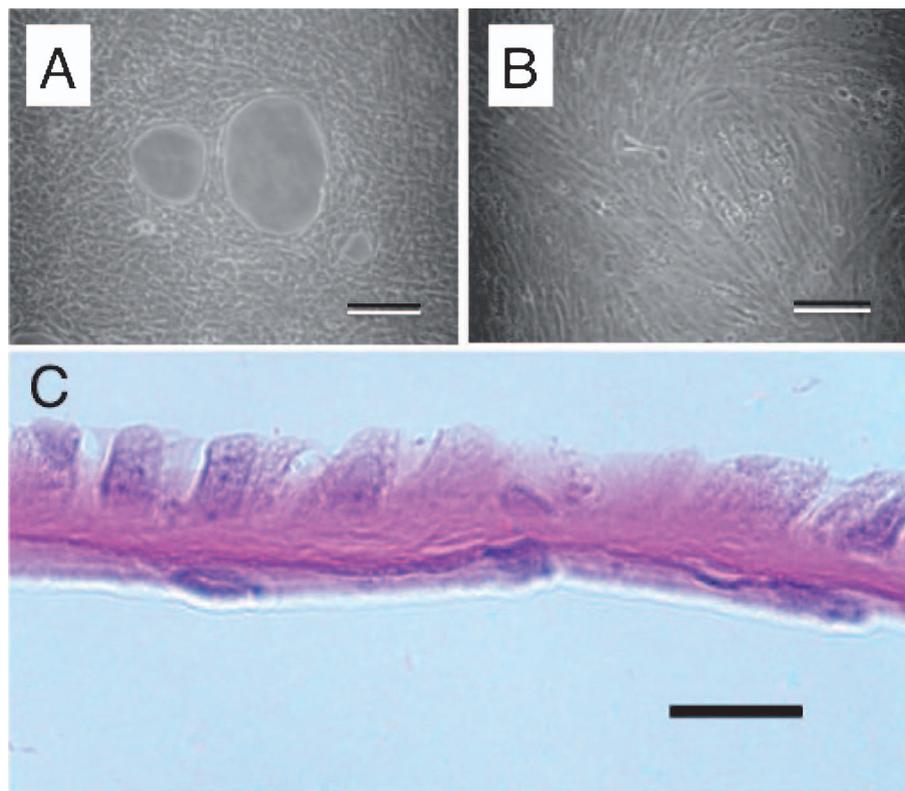


Fig. 4. Reconstitution of Human Normal Endometrium

The glandular cells and the stromal cells were separated from human normal endometrium. The stromal cells were seeded on the collagen vitrigel membrane substratum and were cultured for 3 days in DMEM containing 10% fetal calf serum. Then, the substratum was inverted. The glandular cells were seeded on the substratum and were co-cultured for additional 7 days. The glandular cells (A) and the stromal cells (B) co-cultured on the collagen vitrigel membrane substratum were observed by a phase-contrast microscope. Also, the cross section stained with hematoxylin and eosin was histologically observed by a light microscope (C). Bars represent 100 μm in (A), (B) and 50 μm in (C).

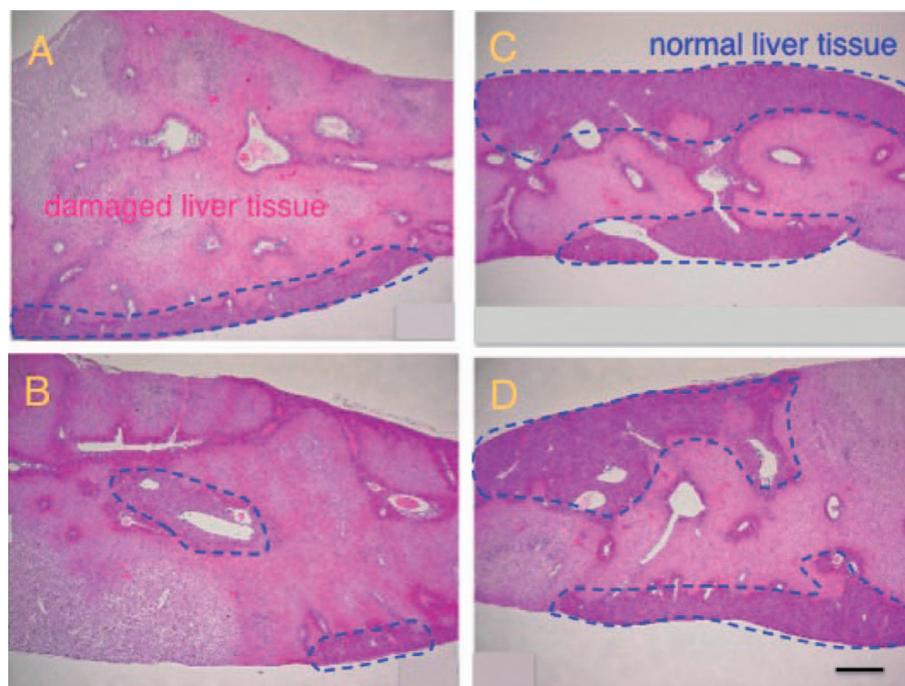


Fig. 5. HGF-containing Vitrigel Protected Post-ischemic Liver Damage in Mice

Mouse liver suffered the insult of 60-min ischemia followed by 24 h-reperfusion. Although the control liver showed massive necrosis after reperfusion (A and B), HGF-vitrigel protected liver damage significantly (C and D). Dotted line shows normal liver tissue. Note that normal liver structure is well preserved near the liver surface in the liver covered with HGF-vitrigel (C and D). Bar represents 500 μm .

HGF 群ではその程度が著明に軽減された [Figs. 5 (C) and (D)]. 血清の生化学的検査 (GOT/GPT/LDH) でも, HGF 群では同様に有意な肝障害の抑制が確認された. また, 免疫組織学的な検討では, HGF 群の非障害肝組織にて HGF の増強が認められた. 現在, 障害抑制の詳細な機序について細胞内シグナル解析などを行っている. 上述の結果より, HGF 含有コラーゲンビトリゲル薄膜を肝臓表面に貼付することで, 薬剤が有効に肝組織に浸透して, 肝障害が抑制されることが示唆された. 今後更なる研究が必要であるが, コラーゲンビトリゲル薄膜は新たな DDS として臨床応用できる可能性が示された.

なお, 本研究で行った動物実験は, 北海道大学動物実験委員会の審査及び承認を得た後, 同大学の動物実験規定及び文部科学省の策定したガイドラインに従って実施した.

8. 創薬支援ツールとしての展開構想

上述してきたように, ピンセットで自在に取扱える透明なコラーゲンビトリゲル薄膜は, 生体を反映した 3 次元培養モデルを容易に構築できる培養担体として有用であるのみならず, 生体適合性の DDS 担体としても活用できることが分かってきた. これらの研究の進展には, コラーゲンビトリゲル薄膜が高分子タンパク質はじめ様々な生理活性分子を透過させる (あるいは, 含蓄させた後に浸出させる) 機能を有した高密度コラーゲン線維の新素材であることが大きく寄与してきた.

今後, 生体を反映した 3 次元培養モデルの開発では, 目的とする培養モデル毎に, 細胞機能を維持又は亢進する生理活性分子をコラーゲンビトリゲル薄膜に含有させるアプローチ, 及び異種細胞間のクロストークを良好に構築するアプローチが重要となってくる. 特に, 創薬支援ツールとして使用する 3 次元培養モデルについては, ①薬効や毒性の評価に用いる動物実験を代替する視点,²⁸⁾ さらには②ヒトの異物 (薬物, 環境化学物質, 食品, 等) に対する応答メカニズムを外挿する視点から, 培養細胞に由来する各種シグナル (代謝酵素, 分泌物, TEER, TEP, 等) を測定する培養システムを構築していく. また, DDS の開発では, 目的とする生理活性分子とその適用に応じて, コラーゲンビトリゲル薄膜からの徐放性を制御する技術を確立していく.

9. おわりに

本稿では, 創薬研究を支援するツールとしてコラーゲンビトリゲル薄膜の有用性を解説することを主眼として, 細胞培養担体ツールとして利用した 3 次元培養モデルの構築とその利便性, 及び DDS 担体ツールとして活用した肝障害の治療効果について紹介した. 3 次元培養モデルとしては眼刺激性・透過性試験モデル, 皮膚感作性試験モデル, 腎糸球体血漿濾過モデル及び子宮内膜治療法モデルの開発現状について述べたが, 今後は他の器官 (特に, 器官の基本ユニット) の評価モデルについても順次開発が進むものと期待している. また, DDS の薬剤としては HGF を取り上げたが, 薬剤を含有させたコラーゲンビトリゲル薄膜は薬効を有する結合組織パッチとして新しい再生医療を実現する可能性を秘めていることから, 今後はタンパク質やペプチドのみならず低分子化合物や遺伝子などについても順次開発が進むものと期待している. このようにコラーゲンビトリゲル薄膜は創薬研究を支援する新しいツールとなり得るので, 上述の開発を推進するために産学官の創薬関連研究者との連携を拡大していければ誠に幸いである.

REFERENCES

- 1) Velazquez O. C., Snyder R., Liu Z. J., Fairman R. M., Herlyn M., *FASEB J.*, **16**, 1316–1318 (2002).
- 2) Tsujii M., Kawano S., Tsuji S., Sawaoka H., Hori M., DuBois R. N., *Cell*, **93**, 705–716 (1998).
- 3) Kusunoki T., Nishida S., Murata K., Tomura T., *Thyroid*, **12**, 281–286 (2002).
- 4) Bell E., Ehrlich H. P., Buttle D. J., Nakatsuji T., *Science*, **211**, 1052–1054 (1981).
- 5) Takushi E., Asato L., Nakada T., *Nature*, **345**, 298–299 (1990).
- 6) Takezawa T., Ozaki K., Nitani A., Takabayashi C., Shimo-Oka T., *Cell Transplant.*, **13**, 463–473 (2004).
- 7) Takezawa T., Takeuchi T., Yanagihara K., Nakazawa Y., Nitani A., Terada S., Ochiya T., Ueno K., *Yakugaku Zasshi*, **128**, 51–60 (2008).
- 8) Takezawa T., *Bio Industry*, **25**, 8–16 (2008).
- 9) Takezawa T., Nitani A., Shimo-Oka T.,

- Takayama Y., *Cells Tissues Organs*, **185**, 237–241 (2007).
- 10) Li S. T., “Biomedical Engineering Fundamentals,” ed. by Bronzino J. D., CRC Press, Boca Raton, 2006, pp. 43–47.
 - 11) Takezawa T., Takeuchi T., Nitani A., Takayama Y., Kino-oka M., Taya M., Enosawa S., *J. Biotechnol.*, **131**, 76–83 (2007).
 - 12) Takezawa T., Ozaki K., Takabayashi C., *Tissue Eng.*, **13**, 1357–1366 (2007).
 - 13) Vinardell M. P., Mitjans M., *J. Pharm. Sci.*, **97**, 46–59 (2008).
 - 14) Becker U., Ehrhardt C., Schneider M., Muys L., Gross D., Eschmann K., Schaefer U. F., Lehr C. M., *Altern. Lab. Anim.*, **36**, 33–44 (2008).
 - 15) Nakamura T., Yamada M., Teshima M., Nakashima M., To H., Ichikawa N., Sasaki H., *Biol. Pharm. Bull.*, **30**, 2360–2364 (2007).
 - 16) McIntosh Ambrose W., Salahuddin A., So S., Ng S., Ponce Márquez S., Takezawa T., Schein O., Elisseeff J., *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.*, **90**, 818–831 (2009).
 - 17) Ko J. A., Liu Y., Yanai R., Chikama T., Takezawa T., Nishida T., *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **49**, 113–119 (2008).
 - 18) Ko J. A., Yanai R., Morishige N., Takezawa T., Nishida T., *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **50**, 2054–2060 (2009).
 - 19) Puleo C. M., McIntosh Ambrose W., Takezawa T., Elisseeff J., Wang T. H., *Lab Chip.*, **9**, 3221–3227 (2009).
 - 20) Uchino T., Takezawa T., Ikarashi Y., Tokunaga H., *Yakugaku Zasshi*, **128**, 45–50 (2008).
 - 21) Uchino T., Ikarashi Y., Tokunaga H., *J. SCCJ*, **41**, 246–253 (2007).
 - 22) Uchino T., Takezawa T., Ikarashi Y., *Toxicol. in Vitro*, **23**, 333–337 (2009).
 - 23) ICCVAM, NIH Publication No. 97–3981, 1997, : http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/about_docs/validate.pdf., cited 27 February, 2010.
 - 24) Basketter D. A., Balikie L., Dearman R. J., Kimber I., Ryan C. A., Gerberick G. F., Harvey P., Evans P., White I. R., Rycroft R. J., *Contact Derm.*, **42**, 344–348 (2000).
 - 25) Ryan C. A., Cruse L. W., Skinner R. A., Dearman R. J., Kimber I., Gerberick G. F., *Food Chem. Toxicol.*, **40**, 1719–1725 (2002).
 - 26) Haneke K. E., Tice R. R., Carson B. L., Margolin B. H., Stokes W. S., *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, **34**, 274–286 (2001).
 - 27) Wang P. C., Takezawa T., *J. Biosci. Bioeng.*, **99**, 529–540 (2005).
 - 28) Takezawa T., “Biomaterials and biodevices for alternative methods to animal testing,” eds. by Sakai Y., Tamiya E., CMC Publishing Co., Ltd., Tokyo, 2007, pp. 174–181.