



# 3Dがん細胞塊を用いた薬物代謝解析 —分子標的薬の代謝予測への応用—

寺島 潤

岩手医科大学 薬学部 薬物代謝動態学講座

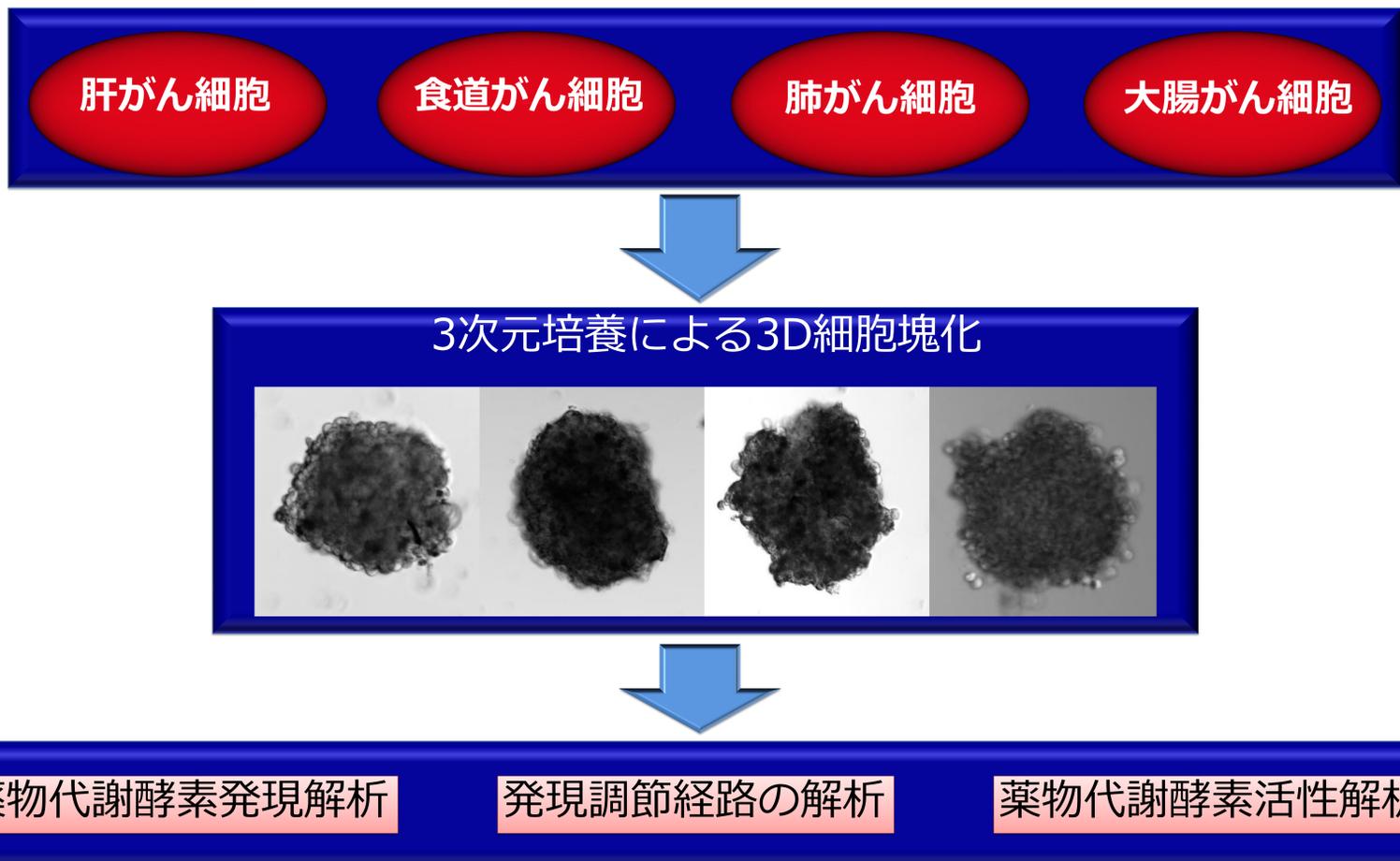
jterashi@iwate-med.ac.jp

## 概要

我々はヒト肝がん培養細胞をより生体内のがん細胞塊に近い3次元で培養し、薬物代謝酵素とその発現調節経路に着目して解析を行っている。これまでに我々は、2次元で培養された細胞と、3D細胞塊では、薬物代謝酵素の発現が異なる経路によって調節されていることを見出した。

その他にもいくつかの3D細胞塊特有の現象が明らかとなっており、3Dがん細胞塊を使った実験系によって得られた知見は、2次元培養細胞よりも、生体内のがん細胞状態を反映したものであると予想している。

## 展望



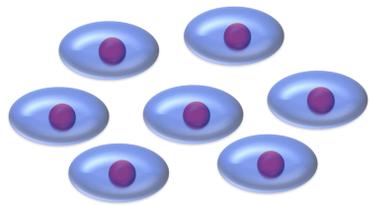
我々は上記の4種のがん細胞を使った3D細胞塊を96 well plate (Prime surface, 住友ベークライト) で構築し、現在までに次の実験系を確立した。

- siRNAを用いた3D細胞塊でのknock-down protocol。
- 凍結切片の作成とそれを用いた抗体染色法。

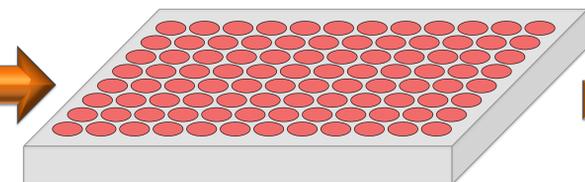
これらを使って、現在は薬物代謝酵素の発現調節経路の解析、細胞塊内でどの部位で薬物代謝酵素が発現しているか、また、がん細胞塊内での薬物代謝酵素とその調節経路の“薬物代謝以外”の役割について解析を行っている。

将来的には、この系を使って薬物代謝酵素に焦点を当てた大規模スクリーニング系の確立を実現したいと考えている。

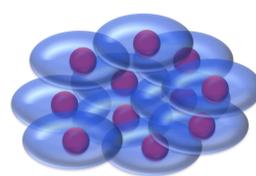
## 培養方法



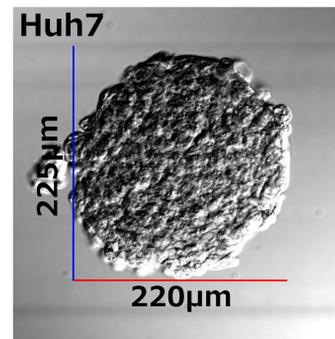
2D cells  
(HepG2 or Huh7)  
1.0x10<sup>4</sup>/ml



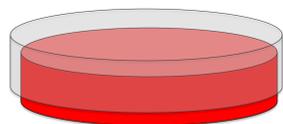
Prime Surface 96well plate  
(SUMITOMO BAKELITE CO. LTD)  
100µl/well (1000cells/well)



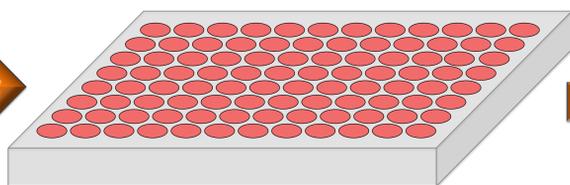
1000cells/spheroid



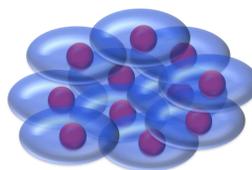
## 遺伝子発現のノックダウン



遺伝子ノックダウンのための  
siRNAと細胞を2次元で培養する  
(24~48時間)



Prime Surface 96well plate  
100µl/well (1000cells/well)



1000cells/spheroid

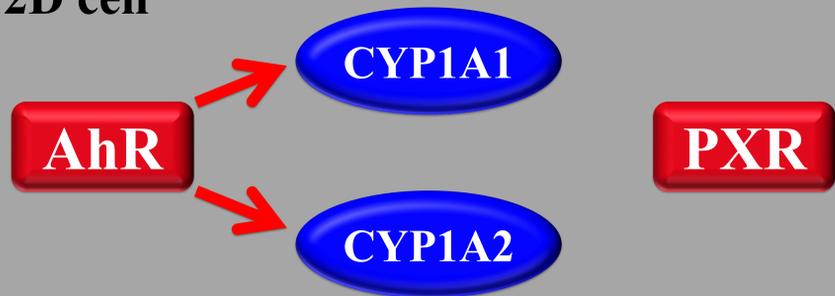
遺伝子抑制効率は  
最大99%

## 現在までに得られた知見

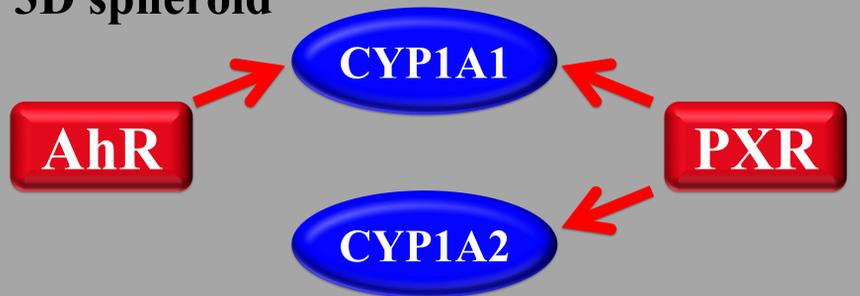
### 2次元状態と3次元状態では遺伝子発現調節経路が異なる

AhR=Aryl hydrocarbon receptor  
PXR=Pregnane X Receptor

#### 2D cell



#### 3D spheroid



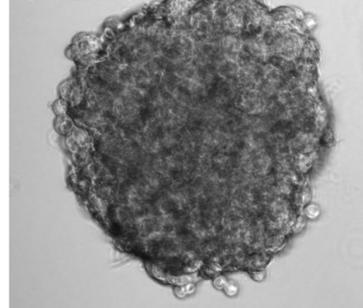
ヒト肝がん由来の培養細胞 (Huh7, HepG2, JHH1) では、2次元状態で培養すると、AhR (Aryl hydrocarbon receptor)によってCYP1A1, CYP1A2の発現が調節される。しかし、細胞を3D細胞塊化すると、CYP1A2はAhRによる発現調節ではなく、PXR (Pregnane X receptor)の発現調節を受ける。またHuh7の3D細胞塊では、CYP1A2だけでなくCYP1A1もPXRの発現調節を受ける。

### AhR pathwayはがん細胞の凝集に関与している

ヒト食道がん由来の培養細胞 (KYSE-70) で、薬物代謝酵素の発現調節因子であるAhRの発現をknock-downすると、プレート内で細胞が凝集せず、controlのような球形の細胞塊が形成されない。

解析の結果、食道がん細胞でAhRをknock-downすると、細胞接着因子の一つである、β-cateninの発現が低下することが明らかとなった。AhRはARNT (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator)と複合体を形成し、CYP1A1などの発現を調節することが知られており、この複合体がβ-cateninの発現に関与しているのかどうかを解析中である。

Control



AhR knock-down

