

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：33602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15815

研究課題名(和文)凍結細胞スフィアを用いた簡便な新規in vitro毒性評価系評の確立

研究課題名(英文) Establishment of a novel and easy in vitro toxicity evaluation system using
frozen cell spheroid

研究代表者

各務 秀明(Kagami, Hideaki)

松本歯科大学・総合歯科医学研究所・教授

研究者番号：80242866

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、新たな細胞凍結技術を用いて、凍結保存可能なin vitro試験用のプレートを開発することである。マウス皮膚線維芽細胞を用いた。通常の平面培養された細胞では、解凍後ほとんど細胞の生存が得られなかった。次に、スフェロイド培養を行ったところ、解凍後も細胞の生存が得られることを確認した。凍結解凍に適切なスフェロイドの大きさ、凍結保護剤の濃度、凍結保護剤の量について検討を行い、最適化を行った。また、凍結したスフェロイドに培地を添加し、洗浄することなく安定した細胞増殖が得られた。本研究により、凍結保存が可能で、解凍後直ちに使用可能なin vitro試験用のプレートのプロトタイプを作成した。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to develop a in vitro test for cell toxicity using a novel cell freezing technology. Mouse skin-derived fibroblasts were used. The cells cultured on a regular dish could not survive, On the other hand, the spheroids from fibroblasts could survive and proliferate after freeze-thaw cycle. Then, various freezing conditions including spheroid size, the concentration of cryoprotectant, and the volume of cryoprotectant were optimized. From this study, we could successfully achieved the in vitro cell toxicity test system using spheroids, which can be used immediately after thaw with culture medium without washing process.

研究分野：再生医療

キーワード：in vitro試験 細胞毒性 線維芽細胞 凍結保存

1. 研究開始当初の背景

これまで新薬の開発や化粧品などの安全性試験には、動物が用いられてきた。しかしながら、動物愛護の立場からは、極力動物を使用しない評価系への移行が望ましく、化粧品では動物実験の完全撤廃に踏み切る企業も少なく無い。動物実験に代わる最も信頼できる評価系は、培養細胞を用いた *in vitro* 試験である。その利点は、動物愛護面のみならず、経費の削減、時間の短縮など多数ある。ヒト細胞を用いれば、動物による種差の影響も避けることができ、さらに iPS 細胞から作製された臓器を構成する細胞は、新薬開発のための重要なツールとなりつつある。

その一方で、*in vitro* 試験には細胞培養、分化、播種など準備に多くの労力が必要であり、タイミング良く使用することは困難である。また、操作には細胞培養や分化など専門的な経験も必要となり、使用できる環境は限られてしまう。もし、必要な細胞がプレート上で凍結保存され、解凍後直ちに使用可能な製品があれば、これまで以上に広く応用されることが期待される。

2. 研究の目的

本研究の目的は、新たな細胞凍結技術を用いて凍結保存可能な *in vitro* 試験用のプレートを開発することである。解凍後直ちに使用可能な *in vitro* 試験システムは、特別な技術が不要で必要時に直ちに使用できる利便性から、一層の動物実験の代償に貢献できる。そのために、これまでわれわれが開発してきたスフェロイド形成法を応用する。

3. 研究の方法

cell line を用いたスフェロイド培養のための条件設定を行い、得られたスフェロイドによる凍結、解凍条件を決定する。特に、スフェロイドのサイズ、使用する凍結保護剤の量、解凍方法について、これまでの予備実験の結果から最適と思われる条件を抽出する。

次に、決定された条件下で実際のプレート上で細胞の凍結保管を行い、得られた細胞の増殖、機能についての評価を行う。

スフィア作製条件の決定

予備実験では、細胞源として NIH-3T3 細胞を用いてスフィア形成の条件を検討した。本研究では、線維芽細胞を用いて、同様の方法でスフィア形成が可能か検討する。

1) 細胞：正常マウス線維芽細胞

2) 培地，凍結保護剤：10%DMSO

3) スフェロイド形成法：回転培養およびスフェロイド形成用プレート (PrimeSurface® 96U, 住友ベークライト) を用いる。

4) 細胞数： $1 \times 10^3 \sim 2 \times 10^4$ まで細胞数を変化させることで、サイズの異なるスフェロイドを形成する。回転培養法、あるいは専用プレートに決められた細胞数を入れることで、自動的にスフェロイドが形成される。

スフェロイド凍結条件の決定

1) 凍結に適したスフェロイドサイズ、およびスフェロイド形成方法の検討

にて調製された各サイズのスフィアについて、凍結解凍を行い、最も高い生存率の得られるサイズを決定する。解凍後のスフィアは、接着性プレートに播種することで接着し、増殖を始める。培養 3 日、7 日に WST-8 を用いて細胞数をカウントする。解凍後細胞数が最大となるスフェロイドサイズを決定する。

2) 凍結保護剤の必要量に関する検討

凍結保護剤を多く使用すれば、解凍後に洗浄操作が不可欠となる。しかしながら、少なすぎれば細胞の生存率が低下する懸念がある。本プロジェクトでは解凍後洗浄を行わないことを目的としているため、細胞の生存率が実用レベルとなる最小限の凍結保護剤の量を決定する。具体的には poly-L-lysine により化学的にスフェロイドをプレートに接着させ、最小限の凍結保護剤を添加して凍結

する。別の可能性として、接着性 24well 培養皿上にクローニングリングを乗せ、凍結保護剤に懸濁したスフィアを入れて凍結する。クローニングリングのサイズから、凍結保護剤の量は最低でも 30 μ l は必要であることがわかっており、40, 50, 60 μ l との比較検討を行う。

プレート上でのスフェロイド凍結と解凍後の細胞の機能評価

1) プレート上でのスフェロイド凍結 - 解凍に関する検討

で定められた条件を用いて、24well プレート上でスフィアの凍結を行う。翌日各 well に 500 μ l の培地を入れて、そのまま 24 時間培養を行う。この間にスフィアは底面に付着し、増殖を始める。細胞増殖の確実性、および 3, 7 日目に得られる細胞数を計測する。

2) 細胞の機能評価

解凍後の細胞機能を評価するため、コラーゲンアッセイキットを用いたコラーゲンアッセイを行う。

4. 研究成果

実験 1：スフェロイド凍結による細胞生存の検討

初にコントロール実験として、プレート上で平面培養した細胞に凍結保護剤として 10% DMSO を添加し、slow freezing protocol にて凍結を行った。解凍後すべて細胞が死滅し、増殖が得られないことを確認した。従ってプレート上の培養ではなく、これまで開発を行い、特許を取得した細胞スフェロイドを用いる新たな凍結保存方法について検討した。回転培養法にて得られたスフェロイドに 10% DMSO を添加し、slow freezing protocol にて凍結し、その後急速融解を行った。解凍後スフェロイドからの細胞増殖を認めた (図 1)

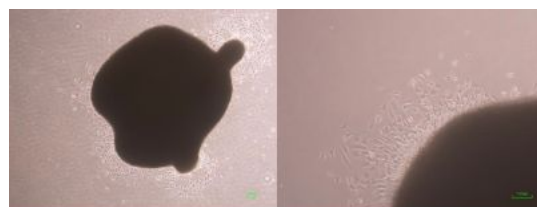


図 1

図 1. スフェロイドに DMSO を添加し、凍結融解することで、細胞の生存を確認した。

実験 2：DMSO 添加量の最適化

本研究では、解凍後洗浄することなく培養、アッセイを行うことのできる系の確立が目的である。そのためには細胞毒性を有する凍結保護材である DMSO は最小量の使用にとどめることが望ましい。そこで細胞スフィア凍結に必要な最小量 DMSO 量を検討した。

適正な凍結保護剤の量はスフェロイドの大きさによって影響を受けるが、invitro 試験に使用可能な細胞数でスフェロイドを作製した場合、30 μ L 以上の凍結保護剤が必要であった。これ以下の凍結保護剤ではスフェロイドの崩壊が起こり、細胞の増殖を得ることができなかった。また、40 μ L 以上では安定した細胞の増殖が得られた (図 2 - 1, 図 2 - 2)。

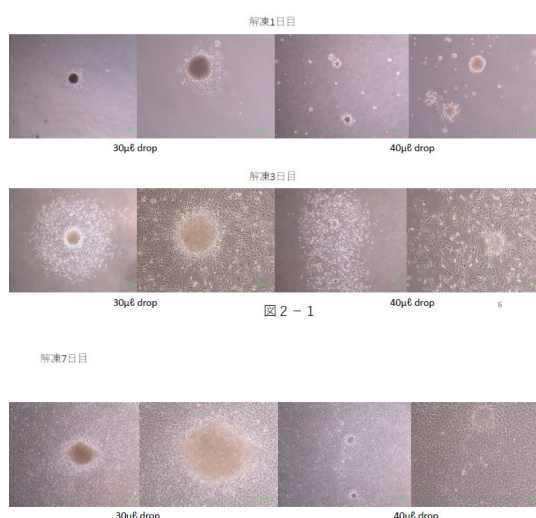


図 2 - 1

図 2 - 2

実験 3：物理的なスフィアのプレートへ固定法検討

スフェロイド培養は浮遊培養であるため、プレート上へ固定しない場合には、凍結・解

凍時にプレート内で移動が起こり、解凍後の増殖が均一に得られない(特にスフェロイドは表面張力等で辺縁部に固定されやすく、細胞の増殖や形態の確認が困難となる事が多かった)。そこで、本研究では poly-L-lysine を用いた化学的な接着と、クローニングリングを用いて、物理的にプレート中央部へスフェロイドと固定する方法について検討を行った。

その結果、化学的な接着ではスフェロイドはプレートへ固定可能あるが、固定されたスフェロイドでは細胞の生存率が極端に低下すること明らかとなった。したがって、スフェロイドを凍結するためには、接着させることなく、浮遊させた状態で凍結することが必要と判断した。また、浮遊状態での凍結には、スフェロイドの移動によって評価が困難となる可能性があるため、合わせてスフェロイドの位置を保つ方法の確立も必要と考えられた。以上の条件を満たす方法として、本研究ではクローニングリングを用いて、スフェロイドをプレート上に固定する方法の有用性を検討した。凍結保存に必要な DMSO の量および、スフェロイドを形成する細胞数についてそれぞれ検討した。その結果、スフェロイドを凍結保護剤に浮遊させた状態で位置を固定し、凍結することが可能であった(図 3 - 1)。次に、この方法で凍結したスフェロイドから、解凍後洗浄せず持続的な培養が可能かどうかを検討した。スフェロイドを形成する細胞数を変化させたところ、 2.8×10^4 以上の細胞数でスフェロイドを形成した場合、解凍後の十分な増殖が得られた。また、クローニングリング内の 10%DMSO30-40 μ l に対して、解凍のために 24 well プレート中に添加する培地量の検討を行った。2 ml 以上の加温した培地を用いて溶解することで、洗浄することなく継続培養が可能であった(図 3 - 1, 図 3 - 2)

次に、この方法で凍結保存したスフェロイ

ドから、安定した細胞増殖が得られるかを確認した。実験に用いた全 well (20/20) で増殖をみると、各 well では培養開始後 7 日間は安定した増殖を認めた。

本研究から、凍結状態で保存し、解凍後洗浄することなく直ちに in vitro 試験に使用できる in vitro 実験系が確立された。

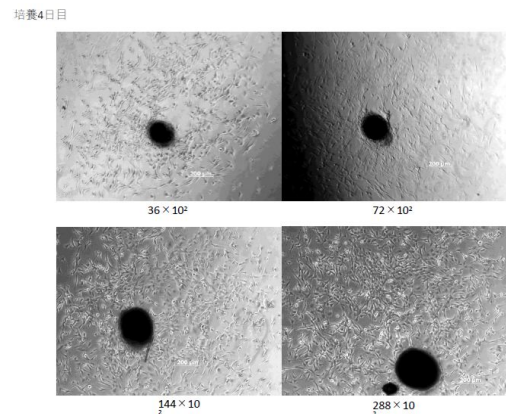


図 3 - 1

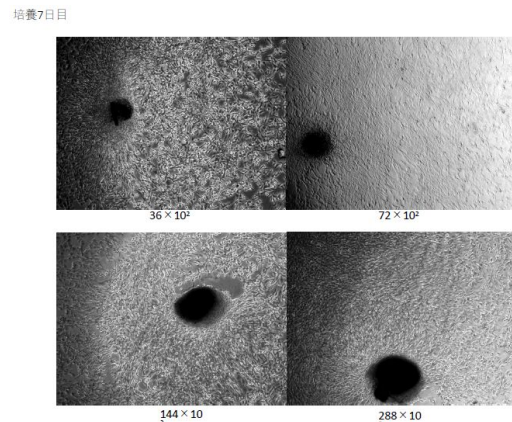


図 3 - 2

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 5 件)

Ikono, Radyum; Mardliyati, Etik; Agustin, Iis; Ulfi, Muhammad; Andrianto, Dimas; Hasanah, Uswatun; Bachtiar, Boy; Mardianingsih, Nofa; Bachtiar, Endang; Maulana, Nurwenda; Rochman, Nurul; Xianqi, Li; Kagami, Hideaki; Nagamura-Inoue, Tokiko; Tojo, Arinobu
Chitosan - PRP nanosphere as a growth

factors slow releasing device with superior antibacterial capability. Biomedical Physics & Engineering Express **in press**.

(査読有)

Kagami H, Inoue M, Kobayashi A, Taguchi A, Li X, Yoshizawa M. Issues with the surgical treatment of antiresorptive agent-related osteonecrosis of the jaws. Oral Dis. 2018 Mar;24(1-2):52-56. doi:

10.1111/odi.12783. (査読有)

Kagami H Potential application of tissue engineering for the reconstruction of facial bones. Oral Dis. 23:6, 689-691, 2017 (査読有)

Xianqi Li, Feng Wu, Yiming Zhang, Jing Yang, Atsushi Shinohara, Kagami H, Discontinuation of simvastatin lead to a rebound phenomenon and results in immediate peri-implant bone loss. Clinical and Experimental Dental Research., 2, 65-72. 2016. (査読有)

Hori A, Agata H, Takaoka M, Tojo A, Kagami H. Effect of cell seeding conditions on the efficiency of in vivo bone formation. Int J Oral Maxillofac Implants, 31:232-239, 2016. (査読有)

{ 学会発表 } (計 5 件)

Hideaki Kagami, Minoru Inoue Xianqi Li , Tokiko Nagamura-Inoue, Arinobu Tojo, Naohide Yamashita Effect of cell processing protocol on the clinical result of bone tissue engineering. Translational Opportunities in Stem Cell Research, an ISSCR International Symposium, 27 February - 1 March, 2017, in Basel, Switzerland.

Inoue M, Hori A, Mori Y, Nagamura T, Tojo A, Kagami H Potential of

human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells for the treatment of salivary gland dysfunction. Translational

Opportunities in Stem Cell Research. 2017.2.27-3.1 スイス・バーゼル

各務秀明 歯槽骨再生治療の実現のための細胞調製システムの構築とその運用「大学病院における閉鎖型自動細胞培養装置を用いた細胞培養とその経過」ランチョンセミナー 5 第 59 回歯科医学会学術大会 **B 会場** 2017.9.18 12:15-12:40

各務秀明、井上実、朝比奈泉、宇田川信之 「骨再生治療：基礎研究から臨床応用まで」骨髄間質細胞を用いた骨再生治療 第 23 回歯科医学会総会 シンポジウム 福岡国際会議場 2016.10.22 9:00-12:00

各務秀明、井上実、朝比奈泉 骨再生とは何か：細胞を用いた骨再生治療から学んだこと 2016.2.14 14:30-15:00 日本口腔インプラント学会 第 35 回関東・甲信越支部学術大会 シンポジウム

{ 図書 } (計 0 件)

{ 産業財産権 }

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

{ その他 }

ホームページ等

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

各務 秀明 (KAGAMI, Hideaki)

松本歯科大学・総合歯科医学研究所・教授
研究者番号 : 80242866

(2) 研究分担者

李 憲起 (Li, Xianqi)

松本歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：60350831