

令和 元年 6 月 10 日現在

機関番号：32613

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K14985

研究課題名(和文) 栄養・酸素・薬剤条件が空間的に規定されたがん細胞スフェロイド培養系の構築

研究課題名(英文) Compartmentalized tumor spheroid culture system for localized anticancer drug treatment

研究代表者

金田 祥平 (Kaneda, Shohei)

工学院大学・工学部・助教

研究者番号：10542467

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、薄膜に設けた貫通穴構造に、細胞の凝集体をはめ込むことで、薄膜の上下で異なる薬剤条件境をスフェロイド(がん細胞凝集体)に対して提示しうる区画化培養系を提案した。培養系の実装にあつては、(1)透明シリコンゴム製薄膜を用いる系(Kaneda et al., Biomicrofluidics 2017)と(2)市販のカルチャーインサートのポリエチレンテレフタレート製薄膜を利用する系のふたつを検討し、貫通穴構造(直径100-400 μm)にスフェロイドをはめ込み、膜により規定されたスフェロイドの一部(膜下に出ている部分)のみを選択的に薬剤処理することが可能であることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで細胞の凝集体(球状の細胞集団)の狙った一部のみを選択的に薬剤を処理する技術は確立されていなかった。本研究では、微細加工技術により設けた薄膜上の貫通穴に細胞の凝集体をはめ込むことで、薄膜の下に出た凝集体の一部のみを選択的に薬剤処理できる技術を開発した。これを用いてiPS細胞の凝集体の狙った一部のみを選択的に分化誘導することを示し、より複雑なiPS細胞由来組織をつくるための本技術の可能性を検討した。また、がん細胞の凝集体の一部のみを抗がん剤で処理可能であることを示し、抗がん剤で処理された少数のがん細胞のふるまいや抗がん剤の浸透性の評価にこの技術を応用する可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：We developed compartmentalized cell culture systems for spherical multicellular aggregate (tumor spheroid or embryoid body (EB)) utilizing a membrane with a microfabricated through-hole. Tumor spheroid/EB were immobilized onto the hole and the membrane was used to define a part of spheroid/EB to be treated with anticancer drugs or differentiation factors. In this project, both (1) a system made of PDMS and (2) a system utilizing a commercialized transwell culture insert were developed. The PDMS-based system (1) was evaluated with EBs derived from ES/iPS cells. By using the system, a localized differentiation (i.e. spatially patterned differentiation) was achieved. The culture insert-based system (2) was realized by a laser processing to bore a through-hole on a porous membrane of a culture insert and fill 0.4 μm-pores by parylene coating. By using the system, a localized anticancer drug treatment for a tumor spheroid were performed.

研究分野：マイクロ流体システム

キーワード：マイクロ・ナノシステム 区画化培養 がん細胞凝集体 iPS細胞 胚様体 局所薬剤処理

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がん細胞の凝集体(スフェロイド)は、がんの三次元 *in vitro* がんモデルとして薬効評価などに用いられている。これは、従来用いられている二次元単層培養系と比較し、細胞集団において薬剤・酸素・栄養条件が一様で無い、すなわち空間的な分布を持つことに起因する細胞性質の不均一性や足場非依存性の細胞増殖能、細胞間相互作用など、生体内のがん組織でみられる特徴をスフェロイドが有すること、また、その作成が容易であることなどによる。しかしながら、スフェロイド内で形成される薬剤濃度などの分布は、スフェロイド最外層が最も高濃度で、中心に向けて同心円的に勾配が形成されるものであり、がん組織でみられる腫瘍血管付近から局所的に薬剤が供給されることにより形成される分布とは、大きく異なっているという問題があった。

In vivo のがん微小環境をより忠実に再現するため、現行の *in vitro* モデルを高度化しようという試みは、創薬プロセスの効率化の観点からもますます重要度を増しており、欧米を中心にバイオマテリアル、ティッシュエンジニアリング、マイクロ流体技術などを組み合わせた、がん細胞培養マイクロシステムに関する学際的な研究が広がりを見せていたが(R. Portillo-Lara *et al.*, *Lab Chip* 2016), 上記のスフェロイドの一部のみに局所的に薬剤を処理可能な技術はまだ確立されていなかった。

これまでに、微小流路内に保持した ES 細胞のスフェロイド(胚様体)に対して、マイクロ流体技術により形成した層流を用いて胚様体の半分ほどの領域に薬剤を処理する技術(W. T. Fung *et al.*, *Lab Chip* 2009)などが報告されていたが、シリンジポンプなどの送液機構が必要であること、また、薬剤の分子拡散により、局所的な処理を行うことが困難であった。

2. 研究の目的

本研究では、スフェロイドの一部のみを局所的に薬剤処理可能な培養系を提案し、これを区画化培養系と呼び、その実装法を開発すると共に、区画化培養系を新たな抗がん剤薬効評価系へと展開するための研究基盤を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、薄膜に設けた貫通穴構造に、細胞の凝集体をはめ込むことで、薄膜の上下で、薬剤条件の異なる培養環境をスフェロイドに対して提示しうる区画化培養系を提案した(図 1)。培養系の実装にあつては、(1)透明シリコンゴム(Polydimethylsiloxane: PDMS)製薄膜を材料に用いる系(図 2)と(2)市販のカルチャーインサートのポリエチレンテレフタレート(Polyethylene terephthalate: PET)製薄膜を利用する系のふたつを検討した。研究期間の前半では、抗がん剤とがんスフェロイドの組み合わせを用いる前に、細胞毒性の少ない分化誘導因子と胚様体との組み合わせにより系の評価を行った。具体的には、(1)では、ソフトリソグラフィ技術により製作した PDMS 製薄膜上の貫通穴構造(直径 100~400 μm)に iPS/ES 細胞の胚様体をはめ込み、薄膜の上下に異なる薬剤条件を提示し、系の評価を行った。(2)では、0.4 μm の細孔を持つカルチャーインサートの PET 製薄膜に、レーザー加工によって貫通穴構造(直径 90~230 μm)を製作し、その後にパリレンを薄膜にコーティングすることで細孔を塞ぎ、区画化培養系を実装した。系の評価には、がん細胞としてヒト肝がん由来細胞株(HepG2 細胞)やヒト前立腺がん由来細胞株(DU-145 細胞)を、抗がん剤としてチラパザミンやパクリタキセルを用い、貫通穴構造にはめ込んだがんスフェロイドに対して、開発した系を用いて、薄膜の上下に異なる薬剤条件(膜上:抗がん剤なし、膜下:抗がん剤あり)を提示し、系の評価を行った。

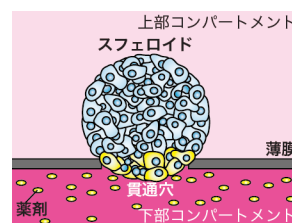


図 1. 貫通穴を持つ薄膜を利用した区画化培養系。

4. 研究成果

(1) 製作した PDMS 製の区画化培養系の貫通穴に iPS/ES 細胞(20000 cells)の胚様体をはめ込み、4 日間の培養が可能であること、薄膜の上下に異なる薬剤条件を提示できることを確認した(図 3)。また、胚様体の分化誘導因子を作用させた胚様体の膜下の一部のみ選択的に分化誘導可能であることを確認した(図 4) (Kaneda *et al.*, *Biomicrofluidics* 2017)。

(2)では、0.4 μm の細孔を持つカルチャーインサートの PET 製薄膜に、レーザー加工によって貫通穴構造(直径 90~230 μm)を製作し、その後にパリレンを薄膜にコーティングすることで細孔を塞ぎ、区画化培養系を実現することに成功した(図 5)。(1)と同様に、薄膜の上下で異なる薬剤条件を提示可能かを蛍光色素を用いて確認した後、がん細胞として HepG2 細胞や DU-145 細胞を、抗がん剤としてチラパザミンやパクリタキセルを用い、貫通穴構造にはめ込んだがんスフェロイドに対して、開

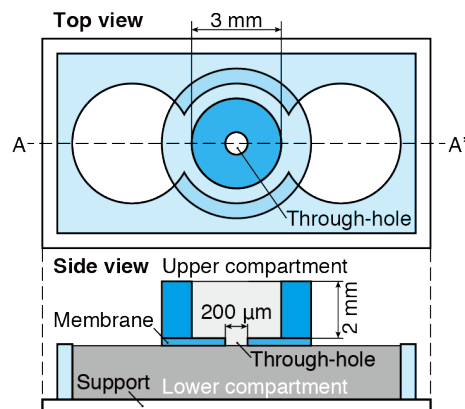


図 2. PDMS を材料として用いた系の模式図。図中の青および水色部分が PDMS を示す。

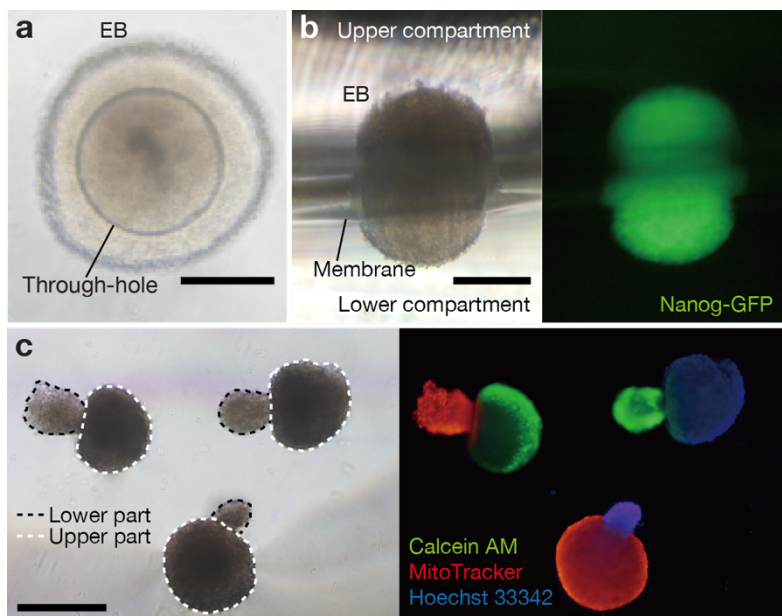


図 3. PDMS を材料とした系の評価試験結果. (a) 貫通穴にはめ込まれた胚様体. (b) 培養 4 日後の胚様体. (c) 薄膜の上下で異なる蛍光色素で処理された胚様体. スケールバー: 200 μm (a), (b), 500 μm (c).

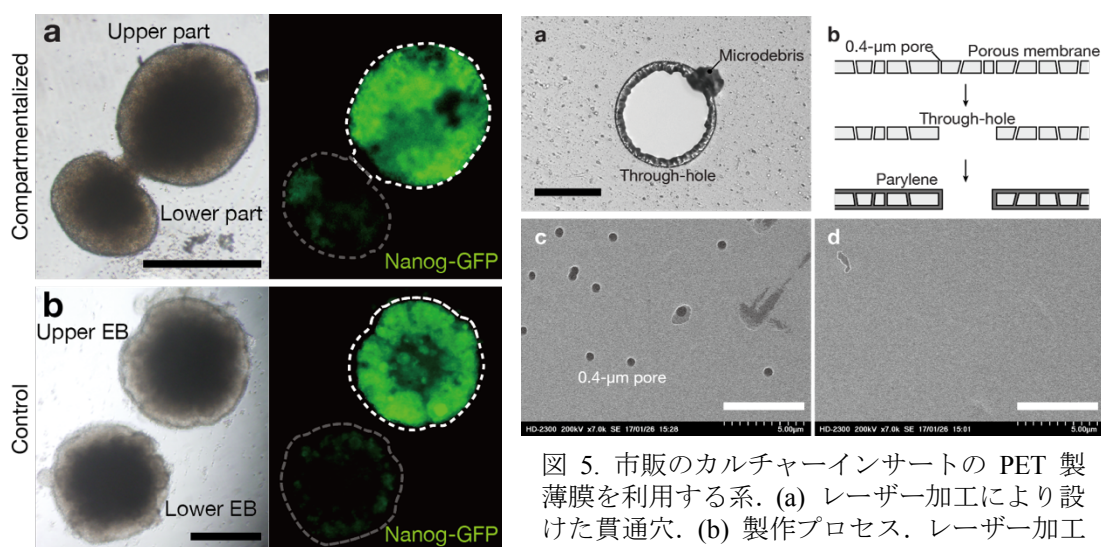


図 4. PDMS を材料とした系での局所的な分化誘導培養結果. (a) 薄膜で規定された胚様体の上部は未分化維持因子で下部は分化誘導因子を処理した結果. (b) ふたつの胚様体を未分化維持因子と分化誘導因子で別々に処理したコントロール. 分化誘導因子の処理による未分化マーカー(Nanog-GFP)の発現低下が認められる. スケールバー: 500 μm .

図 5. 市販のカルチャーインサートの PET 製薄膜を利用する系. (a) レーザー加工により設けた貫通穴. (b) 製作プロセス. レーザー加工により貫通穴を設けたのちに, 0.4 μm の細孔をパリエレン C をコーティングすることで塞ぐ. (c) パリエレン C をコーティング前の薄膜. (d) コーティング後の薄膜. スケールバー: (a) 200 μm , (c), (d) 5 μm . 市販のカルチャーインサートを採用することで, 区画化培養系の製作の簡便化と系の操作性が向上した.

発した系を用いて, 薄膜の上下に異なる薬剤条件(膜上:抗がん剤なし, 膜下:抗がん剤あり)を提示し, 薄膜で規定されたスフェロイドの一部のみ選択的に抗がん剤を作用させることが可能であることを確認している. また, 抗がん剤処理部分と非処理部分のスフェロイドの大きさを面積ならびにその凍結切片と比較することで, 抗がん剤の細胞増殖抑制能ならびにその浸透性を評価しうることを見出している. 一方で, 抗がん剤が高濃度になると, 抗がん剤処理部の細胞死により, スフェロイドが薄膜から外れ, 区画化培養系が破綻することも確認している.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

Kaneda, S., Kawada, J., Akutsu, H., Ichida, J., Ikeuchi, Y., and Fujii, T.: "Compartmentalized embryoid body culture for induction of spatially patterned differentiation", *Biomicrofluidics*, Vol. 11, Issue 4 (2017), 041101. doi: 10.1063/1.4994989

〔その他〕

ホームページ等

http://www.microfluidics.iis.u-tokyo.ac.jp/publish_j.html

シンポジウム等

金田 祥平, "微細加工技術を応用した多能性幹細胞の分化誘導培養系の開発", 第7回医薬工3大学包括連携推進シンポジウム, 2018年10月6日, 工学院大学, 日本(東京).

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：川田 治良

ローマ字氏名：(KAWADA, Jiro)

研究協力者氏名：久米村 百子

ローマ字氏名：(KUMEMURA, Momoko)

研究協力者氏名：篠原 満利恵

ローマ字氏名：(SHINOHARA, Marie)

研究協力者氏名：上野 遼平

ローマ字氏名：(UENO, Ryohei)

研究協力者氏名：河本 智朗

ローマ字氏名：(KAWAMOTO, Tomoaki)

研究協力者氏名：ドミニク コラール

ローマ字氏名：(Dominique, COLLARD)

研究協力者氏名：藤田 博之

ローマ字氏名：(FUJITA, Hiroyuki)

研究協力者氏名：藤井 輝夫

ローマ字氏名：(FUJII, Teruo)

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。