

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 23 日現在

機関番号：82612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25560248

研究課題名(和文) 磁性ナノ粒子を用いたコンビナトリアル・セルクラスターによる評価システムの構築

研究課題名(英文) Construction of a cytotoxicity and function evaluation system using combinatorial cell clusters with magnetic nanoparticles

研究代表者

宮本 義孝 (MIYAMOTO, Yoshitaka)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・細胞医療研究部・リサーチアソシエイト

研究者番号：20425705

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本課題では、磁性ナノ粒子を用いたコンビナトリアル・セルクラスターによる評価システムを構築することを目的とした。開発したデバイスは、様々な大きさのセルクラスターを一度の播種操作で効率よく作製することに成功した。さらに、市販MRI造影剤、開発した磁性ナノ粒子(MRI造影剤)を用いて、デバイス上で作製したコンビナトリアル・肝細胞クラスターによる毒性・機能評価を行った。結果、得られたクラスターによる生死判定、増殖解析、機能毒性解析とともに、タンパク質レベルでの機能発現も評価することができた。また、他の細胞種(脂肪由来幹細胞など)でも毒性・機能評価による再現性・有効性も確認できている。

研究成果の概要(英文)：This study aims to construct an evaluation system by combinatorial cell clusters. The cell clusters with various sizes were successfully prepared efficiently on our developed micro-fabricated device in a one-cell seeding. Furthermore, commercially available MRI contrast agents and our magnetic nanoparticles for MRI imaging were assessed for toxicity and cell functions by combinatorial hepatocyte clusters formed on this device. As a result, resultant clusters were also successfully evaluated for cell viability, cell proliferation, cytotoxicity, and functions at the protein level. Furthermore, it was possible to confirm the reproducibility and efficacy of other cell types such as adipose-derived stem cells on their toxicity and functions.

研究分野：複合領域、再生・移植医療、細胞・組織工学、医療技術評価

キーワード：細胞 クラスター 磁性ナノ粒子 マイクロデバイス 移植医療 細胞医療 毒性評価 医療技術

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、磁性ナノ粒子などのナノマテリアルが注目され、医療現場での利用を考えると、これらナノ粒子の安全性や毒性を評価することは必要不可欠である。そこで、本課題では、磁性ナノ粒子の毒性、および安全性評価を行うために、三次元培養によって作製したセルクラスターを用いる。

(2) 従来、単層培養による *in vitro* 評価法が主流であるが、より生体環境に近づけるために、三次元培養で作製したセルクラスターを用いることで、細胞の機能発現を向上させることができる。本課題では、1つのマイクロデバイス内に、異なる大きさのセルクラスターを一度に作製し(コンビナトリアル・セルクラスター)、磁性ナノ粒子の毒性・安全性が評価可能なシステムを構築できるかを検証する。

(3) 本システムのような医療をサポートする技術の評価することで、診断および治療で利用する医療用ナノマテリアルの安全性が確保できるかを検証する。

2. 研究の目的

(1) 評価デバイスの作成

様々な大きさのセルクラスターを一度に調製できる評価デバイスを作製する。

(2) 株化細胞による評価系の確立

作製した評価デバイスを用いて、株化細胞によるコンビナトリアル・セルクラスターを作製する。特に、異なる大きさのセルクラスターを均一に効率よく作製できるかを検証する。さらに、磁性ナノ粒子の毒性評価系を構築する。

(3) 新鮮細胞・動物実験による評価手法の検証

作製した評価デバイスを用いて、新鮮細胞によるコンビナトリアル・セルクラスターの作製と磁性ナノ粒子の *in vitro/in vivo* 評価を行う。

3. 研究の方法

(1) マイクロデバイスの作製

細胞培養デバイスを用いたセルクラスターの調製は、同一サイズのクラスターを用いた評価法が主流であり、薬剤が細胞・組織に与える影響を評価するためには、一度に様々な条件設定を行える評価系の構築が必要不可欠である。本課題では、一度に異なる大きさのセルクラスターを作製し(コンビナトリアル・セルクラスター)、磁性ナノ粒子(他、薬剤など)を用いた毒性評価が可能なデバイスの作製を目指した。

(2) 株化細胞による評価系の確立

株化細胞として、ヒト肝癌由来細胞株

HepG2細胞を使用した(ATCCより購入)。

本実験では、作製したデバイス上に、HepG2細胞を播種し、37°C、5%CO₂下で培養した。培養後に、得られたコンビナトリアル・HepG2細胞クラスターより、デバイスの再現性および有用性を検証した。

続いて、HepG2細胞クラスターの安全性評価、毒性評価を行うために、磁性ナノ粒子として、デキストランで被覆された超常磁性酸化鉄微粒子(アニオン性、市販MRI造影剤リゾビスト)、および開発したカチオン性磁性ナノ粒子(TMADM-03)を用いた。

(3) 新鮮細胞・動物実験による評価手法の検証

細胞ソースとして、組織由来細胞に注目し、主に、初代肝細胞、脂肪由来幹細胞の2種類を使用した。初代肝細胞は、コラゲナーゼ灌流法を用いて、肝臓から採取した(Male ICR mice, and Male Sprague-Dawley rats)。マウス脂肪由来幹細胞(Passages 2-5)は、マウス鼠径部の脂肪組織から採取し、継代培養した(Female C57BL/6 mice)。ヒト脂肪由来幹細胞は、インフォームドコンセントにより供給されたZen-Bio社製、継代数2を使用した(#ASC-F, LotASC062801; sex/age/BMI (average)/Number of patients: Female/37/23.29/1 (single))。

本実験では、作製したデバイス上に、初代肝細胞、脂肪由来幹細胞を播種し、37°C、5%CO₂下で培養した。培養後に、デバイス上で、得られたコンビナトリアル・セルクラスターの形成や機能の再現性および有用性を検証した。続いて、セルクラスターの安全性評価、毒性評価を行うために、磁性ナノ粒子として、市販MRI造影剤(リゾビスト)、および開発したカチオン性磁性ナノ粒子(TMADM-03)を用いた。また、ラットの尾静脈より、磁性ナノ粒子を投与し、1時間経過した後、血液サンプルを回収しアルブミン等への影響を評価した。

(4) ヒト細胞および実験動物を用いることに対する倫理的配慮

本研究では、ヒト由来細胞および実験動物を用いた研究を行う。機関の外部委員を含めた倫理審査委員会において生命倫理、安全管理を厳重に審査する。倫理委員会の承認かつ実施施設の長の許可を得て、全ての研究を遂行する。

実験動物を用いる研究については、国立成育医療研究センター動物実験指針に準拠して研究を実施する。特に、動物愛護と動物福祉の観点から実験動物使用は、目的に合致した最小限にとどめる。またその際、麻酔等手段により苦痛を与えない等の倫理的配慮をおこなう。実験者は、管理者と相互協力のもと適切な環境のもと飼育管理を行う。

4. 研究成果

(1) マイクロデバイスの作製

微細加工技術を用いて、ポリジメチルシロキサン (PDMS) から成る 'TASCL' (Tapered Stencil for Cluster Culture) を作製した。

細胞培養基材上に TASCL デバイスを設置し、細胞を播種すると、細胞は重力により各貫通孔底面に向かって沈降する。これにより、細胞の分布形状は、貫通孔壁面の下部境界によって規定される。特に、TASCL デバイス上の各貫通孔の上部形状 (Top aperture) と、下部形状 (Bottom aperture) を規定することにより、任意の分布形状と分布密度下で、クラスターを形成することができる。

本課題では、10mm 四方の基板の上に、1 ウェルあたり、上部正方形の一辺が 400×400 、 600×600 、 $800 \times 800 \mu\text{m}$ の 3 通り、下部 $\phi 140$ 、 180 、 240 、 $280 \mu\text{m}$ の 4 通りの貫通孔を密に配置したコンビナトリアル TASCL デバイス (図 1) と上部正方形一辺が $500 \times 500 \mu\text{m}$ 、下部 $\phi 300 \mu\text{m}$ の貫通孔を密に配置した同径 TASCL デバイスを作製し、PEO-PP0-PEO トリブロックコポリマー (1 wt% Anti-Link) で親水化処理した。

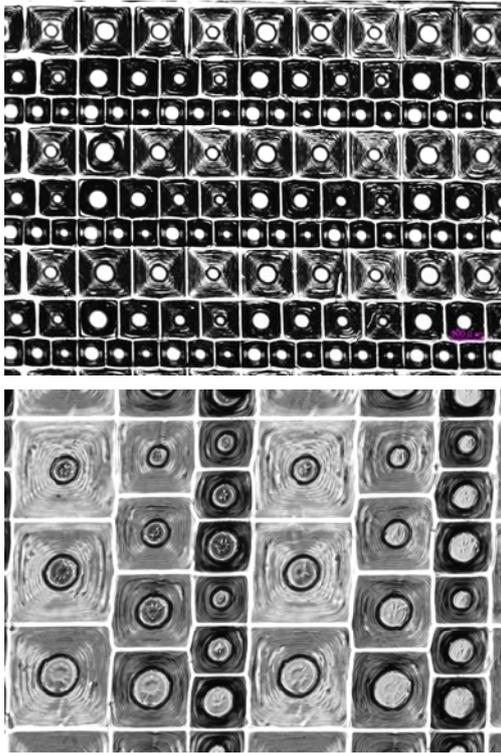


図 1. コンビナトリアル型 TASCL デバイスの作製。Scale bar $500 \mu\text{m}$ 。

(2) マイクロデバイスによるセルクラスターの創製とデバイス設置培養皿の選定

本課題では、親水化処理済みのコンビナトリアル TASCL デバイスに対して、①TASCL 底面の培養皿の選定、②セルクラスターの形成、③セルクラスターの機能評価、④実験の再現性について検証した。細胞ソースとして、マウス肝臓から分離した新鮮肝細胞を用いて

評価した結果、①ポリスチレン培養皿上でセルクラスターの形成が可能である。②異なる大きさ ($\phi 100 \sim 200 \mu\text{m}$) のコンビナトリアル・セルクラスターを一度に作製できる。③各々のセルクラスターで生細胞 (Calcein-AM) が観察され、アルブミン値も測定可能範囲である。④実験の再現性が確認できた。

さらに、セルクラスター形成率を向上させるために、超低接着性培養皿 (Corning Ultra-Low Attachment) 上に同径 TASCL デバイスを設置して、HepG2 細胞を用いて検証した。結果、デバイス内のセルクラスターの形成率、回収率ともに 100% に近く、初期播種密度 (4×10^4 、 2×10^5 、 $4 \times 10^5 \text{ cells/TASCL}$) の増加に伴い、ウェル内のクラスターの大きさも増加した ($0.8 \times 10^6 \mu\text{m}^3$ 、 $2.8 \times 10^6 \mu\text{m}^3$ 、 $5.7 \times 10^6 \mu\text{m}^3$)。さらに、走査電子顕微鏡より、クラスターは均一な球状構造を有し、肝機能としてアルブミン値も測定可能範囲であるため、本セルクラスターシステムの有効性が示せた。

以上の結果より、TASCL デバイスを設置する培養皿を、超低接着性培養皿 (Corning Ultra-Low Attachment) に決定し、以下の実験に用いた。

(3) マイクロデバイスによるセルクラスターの創製と細胞の種類による影響

超低接着性培養皿 (Corning Ultra-Low Attachment) 上に、親水化処理済みの同径 TASCL デバイスを設置して、初代肝細胞、脂肪由来幹細胞、およびヒト iPS 細胞を播種し、 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 下で培養した。そして、デバイス内で、得られたセルクラスターの大きさおよびその形成率を評価した。結果、使用したどの細胞も、デバイスへの接着は見られず、培養 48 時間後には、HepG2 細胞と同様に、きれいな球状構造が観察された。また、細胞播種数に比例して、セルクラスターの大きさは増加した。各ウェル間では、均一な大きさのセルクラスターが高効率で確認できた。同様に、コンビナトリアル TASCL デバイス上でも、デバイスへの細胞接着は見られず、培養 48 時間後には、異なる大きさのコンビナトリアル・セルクラスターを一度に作製することに成功した。

(4) マイクロデバイスによるセルクラスターの創製と磁性ナノ粒子の毒性評価系の構築

磁性ナノ粒子として、市販 MRI 造影剤 (リゾビスト)、および開発したカチオン性磁性ナノ粒子 (TMADM-03) を用いて、コンビナトリアル・セルクラスターによる毒性評価を行った。まず、2 種類の磁性ナノ粒子を HepG2 細胞クラスターに添加し ($26 \mu\text{g Fe}/350 \mu\text{L TASCL}$)、細胞生死判定 (Calcein-AM/Ethidium homodimer)、細胞増殖解析 (Edu)、細胞機能毒性解析 (グルタチオン、ミトコンドリア膜

電位、ROS など) について評価した。図 2 には、HepG2 細胞クラスターの生死判定に関する顕微鏡写真を示す。また、コントロールは、磁性粒子の非添加群とした。結果、本実験系において、単層培養と同様に、三次元培養(クラスター)においても、生死判定、および毒性に有意な差は見られなかった。また、ラットに対して磁性ナノ粒子投与実験を行った結果、非投与群と比べて、有意な差は見られなかった。一方、肝障害を引き起こすアセトアミノフェンのような薬剤を用いると、HepG2 細胞クラスターへの肝毒性が確認できた。以上より、マイクロデバイスによるセルクラスター評価システムを構築することに成功した。また、他の細胞でも、磁性ナノ粒子を添加した時に同様の傾向が見られ、今後、さらなる再現性・有効性を検証してゆく。

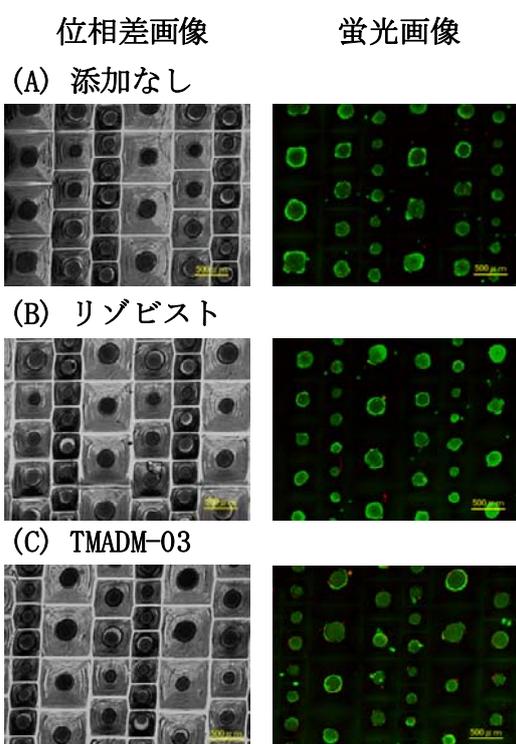


図 2. HepG2 細胞クラスターの生死判定。(A) 磁性ナノ粒子非添加(コントロール)。(B) リゾピスト添加。(C) TMADM-03 添加。蛍光画像 Calcein-AM: 緑, Ethidium homodimer: 赤。Scale bar 500 μ m.

本課題では、マイクロデバイスを用いて、一度に異なる大きさのコンビナトリアル・セルクラスターを作製し、磁性ナノ粒子の毒性を評価できるシステムの構築に成功した。本システムは、磁性ナノ粒子のような医療用ナノマテリアルだけでなく、様々な薬剤等の毒性・安全性評価技術への応用が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

- ① [Miyamoto Yoshitaka](#), [Ikeuchi Masashi](#), [Noguchi Hirofumi](#), [Yagi Tohru](#), [Hayashi](#)

Shuji. Enhanced Adipogenic Differentiation of Human Adipose-derived Stem Cells in an In Vitro Microenvironment: The Preparation of Adipose-like Microtissues using a Three-dimensional Culture. Cell Med. 査読有、accepted.

- ② [Miyamoto Yoshitaka](#), [Ikeuchi Masashi](#), [Noguchi Hirofumi](#), [Yagi Tohru](#), [Hayashi Shuji](#). Spheroid Formation and Evaluation of Hepatic Cells in a Three-Dimensional Culture Device. Cell Med. 査読有、26;8(1-2)、2015、47-56.

DOI: 10.3727/215517915X689056.

- ③ [Miyamoto Yoshitaka](#), [Ikeuchi Masashi](#), [Noguchi Hirofumi](#), [Yagi Tohru](#), [Hayashi Shuji](#). Three-Dimensional In Vitro Hepatic Constructs Formed Using Combinatorial Tapered Stencil for Cluster Culture (TASCL) Device. Cell Med. 2014 Dec 12;7(2):67-74.

DOI: 10.3727/215517914X685187.

〔学会発表〕(計 11 件)

- ① [宮本 義孝](#), [池内 真志](#), [野口 洋文](#), [鈴木 聡](#), [八木 透](#), [生田 幸士](#), [林 衆治](#). コンビナトリアル・セルクラスターによる評価系の構築と技術評価一例として、磁性ナノ粒子による毒性評価一。第 15 回日本再生医療学会総会、2016 年 3 月 17 日-19 日、大阪国際会議場(大阪)

- ② [宮本 義孝](#), [池内 真志](#), [野口 洋文](#), [鈴木 聡](#), [八木 透](#), [生田 幸士](#), [林 衆治](#). コンビナトリアル・セルクラスターによる評価システムの構築一肝細胞クラスターによる磁性ナノ粒子の毒性評価一。第 42 回日本臓器保存生物医学学会学術集会、2015 年 11 月 13-14 日、いわて県民情報交流センター(盛岡)

- ③ [宮本 義孝](#), [池内 真志](#), [野口 洋文](#), [鈴木 聡](#), [八木 透](#), [生田 幸士](#), [林 衆治](#). 培養デバイス TASCL を用いた肝細胞組織体の創製。第 22 回 H A B 研究機構学術年会、2015 年 6 月 26 日-27 日、昭和大学(東京)

- ④ [宮本 義孝](#), [池内 真志](#), [野口 洋文](#), [鈴木 聡](#), [八木 透](#), [生田 幸士](#), [林 衆治](#). 培養デバイス TASCL による初代肝細胞スフェロイド培養、および均一・大量生産系の確立。第 54 回日本生体医工学学会大会、2015 年 5 月 7-9 日、名古屋国際会議場(名古屋)

- ⑤ 宮本 義孝、池内 真志、野口 洋文、鈴木 聡、八木 透、生田 幸士、林 衆治. 新規培養デバイスTASCLを用いた肝細胞スフェロイドアレイ. 第14回日本再生医療学会総会、2015年3月19-21日、パシフィコ横浜(横浜)
- ⑥ 宮本 義孝、池内 真志、野口 洋文、鈴木 聡、八木 透、生田 幸士、林 衆治. TASCLを用いた初代分離・培養細胞組織体の創製. シンポジウム:細胞アッセイ技術の現状と将来(細胞アッセイ研究会)、2015年1月13日、東京大学生産技術研究所コンベンションホール(東京)
- ⑦ 宮本 義孝、池内 真志、野口 洋文、鈴木 聡、八木 透、生田 幸士、林 衆治. 培養デバイス‘TASCL’による三次元肝細胞組織体の機能評価. 第41回日本臓器保存生物医学会学術集会、2014年11月28-29日、千里ライフサイエンスセンター(大阪)
- ⑧ 池内 真志、豊田 悠司、宮本 義孝、生田 幸士、林 衆治. 胚様体の均一・大量生産を実現する培養デバイス“TASCL”の量産化. 第41回日本臓器保存生物医学会学術集会、2014年11月28-29日、千里ライフサイエンスセンター(大阪)
- ⑨ 宮本 義孝. 糖機能材料の再生・細胞医療への応用. Young Cell & Tissue Engineering セミナー(招待講演:徳島大学 STS 研究部フロンティア研究センター共催;セルプロセッシング計測評価研究部会共催)、2013年11月11日、徳島大学(徳島)
- ⑩ 宮本 義孝. 高分子材料における創薬分野および再生・移植医療への応用. 第85回千葉地域活動高分子交流講演会(招待講演:高分子学会関東支部主催)、2013年11月12日、千葉工業大学(津田沼)
- ⑪ 宮本 義孝、池内 真志、野口 洋文、生田 幸士、林 衆治. 3次元微細加工技術を利用した培養デバイス TASCL による脂肪由来幹細胞の機能評価. 第40回日本臓器保存生物医学会学術集会、2013年11月9-10日、東京医科大学(東京)

[図書](計1件)

- ① 長森 英二、宮本 義孝. 生物工学会誌、特集 再生医療実現に向けた幹細胞培養工学の最前線、Vol. 92、No. 9、2014、pp. 468

[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
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮本 義孝 (MIYAMOTO, Yoshitaka)
国立成育医療研究センター・細胞医療研究部・リサーチアソシエイト
研究者番号: 20425705

(2) 研究分担者

池内 真志 (IKEUCHI, Masashi)
東京大学・先端科学技術研究センター・講師
研究者番号: 90377820

(3) 連携研究者

野口 洋文 (NOGUCHI, Hirofumi)
琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・教授
研究者番号: 50378733

八木 透 (YAGI, Tohru)

東京工業大学・大学院情報理工学研究科・准教授
研究者番号: 90291096

(4) 研究協力者

林 衆治 (HAYASHI, Shuji)

鈴木 聡 (SUZUKI, Satoshi)

生田 幸士 (IKUTA, Koji)