

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：12301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26560236

研究課題名(和文) マイクロカプセル合成・複合技術の細胞選択性足場への応用

研究課題名(英文) An application of integrated microcapsule technology for preparation of cell-specific scaffold

研究代表者

土橋 敏明 (DOBASHI, TOSHIAKI)

群馬大学・大学院理工学府・教授

研究者番号：30155626

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)：紫外線照射ゼラチンマイクロカプセル足場上での懸濁培養では、線維芽細胞WI-38は接着・増殖するががん化した細胞WI-38-VA13は接着・増殖しないことが分かっている。本研究ではこのような正常細胞とがん化した細胞の性質の違いをもたらす足場調製条件を明らかにし、応用の元となる技術の開発を行うことを試みた。研究の結果、このような細胞種選択性は足場作製時の紫外線照射量によって制御できること、分化度の異なる胃がん細胞の接着・増殖も紫外線照射量に依存することが分かった。また、抗がん剤との併用により接着・増殖性を変えることができることが分かった。

研究成果の概要(英文)：Human fibroblast cells WI-38 can be cultured on a UV-irradiated gelatin microcapsule scaffold, whereas cancered cells WI-38-VA-13 can not be grown on the microcapsules. In this study we tried to determine the preparation condition of such cell-specific scaffolds and develop a new technology using the scaffold for medical applications. We found that (1) the cell-specific property is controlled by dose of UV irradiation, (2) the cell-specificity depends on the differentiation degree of stomach cancer cells, and the cell adhesion and proliferation can be modified by the combination of scaffold and anti-cancer agent.

研究分野：バイオレオロジー

キーワード：足場 細胞接着 細胞増殖 ゲル 紫外線

1. 研究開始当初の背景

(1)細胞が増殖するためには、多くの場合、“かたい”足場が必要であるとされているが、必要とされる物性には、力学的性質だけでなく、表面の形、表面張力、表面水の状態、電荷、親和性なども含まれることがわかっている。これらの物理化学的性質によって規定される足場の状態を制御する方法の一つとして、照射線量によって表面構造および物性を連続的に変化させることのできる高エネルギー電磁波（ガンマ線、電子線、紫外線など）の利用は理に適っている。高エネルギー電磁波による表面改質については、金属あるいは合成高分子についての多くの報告があるが、生体材料表面の構造、表面における物理化学的性質及び材料と接した細胞や組織の生理学的性質の変化については報告が少ない。例えば、ガンマ線による改質では全照射線量だけでなく照射線量率も影響することは最近の研究でようやく分かってきたところであり、細胞との相互作用への影響についてはほとんどわかっていない。高エネルギー電磁波の生体材料表面への影響について知ることは今後の生体材料開発への応用に対する基礎的研究としても重要である。さらに、この方法による架橋形成では、いっさいの有機溶媒・架橋剤・ラジカル発生剤を用いる必要がないことから環境及び生体に対する毒性がない利点があり、よりいっそうの有効利用が期待される。

(2) 紫外線照射ゼラチンマイクロカプセル上で繊維芽細胞を増殖させた時、正常繊維芽細胞 WI-38 は接着する一方、がん化した細胞 WI-38-VA-13 は接着しないことが見出された[1-3]。図1左は紫外線照射により改質されたゼラチンマイクロカプセル上で WI-38 と WI-38-VA-13 を培養した結果を示す顕微鏡写真であるが、カプセル上での接着・増殖に明確な違いがあることを示している。一方、図1右に示されるように、市販の懸濁培養に用いられる微粒子 Cytodex1 上では正常細胞とがん化した細胞の増殖には明らかな違い

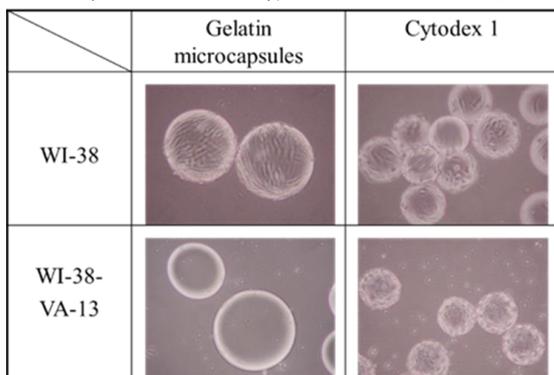


図1 紫外線照射ゼラチンマイクロカプセルと Cytodex 1上で懸濁培養した線維芽細胞WI-38とがん化した細胞WI-38-VA-13

が見られない。これは、マイクロカプセル壁膜作製に用いた紫外線がマイクロカプセル表面の性質を変化させ、表面感受性の異なる正常細胞とがん化した細胞の接着・増殖性に違いをもたらしたものと考えられる。

(3) がんの早期発見・早期治療が定着し、治療実績は年々高まってきているが、腹膜播種の場合は、臓器をほとんどすべて摘出したとしても、腹腔内に散らばったがん細胞に対処することは著しく難しく大きな問題となっている。現在では、経口摂取や腹腔内直接投与による抗がん剤の併用が一定の成果を挙げているが、抜本的解決方法は見出されておらず何らかのブレークスルーが必要とされている。また、抗がん剤の投与には少なからず正常細胞への副作用も避けられない。

2. 研究の目的

高エネルギー電磁波を放射線架橋性高分子の溶液またはゲルに照射すると、照射により生じるラジカルの寿命と照射線量率に応じて、高分子の凝集構造と物理化学的性質の異なる表面を形成させることができる。このことを利用して、照射によってゲル細胞足場の性質を変化させることを考える場合、目的とする正常細胞に対してがん化した細胞の接着・増殖性に大きな違いをもたらす照射条件を見出し、これを制御できる可能性がある。さらに、このような正常細胞とがん化した細胞の“選択的な接着・増殖”を生体内でも行うことができる可能性がある。この技術の用途を考える過程で、腹膜播種の問題に思い至った。すなわち、①がん切除手術後に、正常細胞のみ増殖させ、がん細胞は増殖させない、②細胞寿命の後に自己分解または生分解する、という条件を満たす薄膜（足場）で病変全体を覆うことができれば新しい治療法に結び付く可能性がある。本研究では、将来的な腹膜播種の治療を念頭に置いて、以上の条件を満たす材料を作るために必要な基礎研究と応用技術の開発を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1)足場の作製

マイクロカプセルは、膜乳化法を用いて作製した。300 ミクロン程度のほぼ一定の直径を持つゼラチンを含む W/O エマルジョンを冷蔵庫内で物理ゲル化させた後、紫外線を照射することにより壁膜を架橋しゲル化させた。得られたマイクロカプセル懸濁液を順次、親水性のより大きな溶媒で置換し、最終的に生理食塩水中のマイクロカプセルとした。マイクロカプセル調製の際のゼラチン濃度と紫外線照射量を変数として種々のマイクロカプセルを調製した。さらに、応用を見据えて細胞組織への塗布が可能であるクリーム状マイクロカプセル分散液の調製を試みた。紫外線照射ゲルの物性を調べるために、扱い

が簡単なゲルシート足場を作製した。低温で高濃度に濃縮したゼラチン物理ゲルシートを紫外線架橋することにより化学架橋し、生理的温度でも長時間安定なゲル状態を保持するゲルシート足場を作製することができた。また、ゼラチンは紫外線照射(UV ゲル)以外に transglutaminase などの酵素の添加によっても化学ゲル(TG ゲル)となることから、これらを用いたゲル化も併せて行い、足場が細胞接着・増殖に関する正常細胞とがん化した細胞の違いをもたらす原因を探った。また、変性する前のコラーゲンコートに紫外線照射してできたゲル(CC ゲル)での細胞培養も行った。

(2) 紫外線照射ゲルシートの作製条件による構造及び弾性率の変化に関する測定と解析
ゲル調製時のゼラチン濃度と紫外線照射量の異なるゲルシートについて、ヤング率の測定及び膨潤度の測定を行った。これより、ゲルの架橋密度を評価した。

(3) 紫外線照射ゲル足場上での細胞培養
細胞培養は、浮遊系細胞用プレートを使用して行った。マイクロカプセル足場を用いた実験ではシーソー型攪拌器による懸濁培養法を用いた。エタノール滅菌したマイクロカプセルと培養細胞を培養液に懸濁し5日間の細胞培養を行った。培養細胞は正常及びがん化した繊維芽細胞(WI-38、WI-38-VA-13)に加えて分化度の異なる胃癌細胞(低分化型MKN45、中分化型MKN74、高分化型MKN7)を用いた。培養後のプレートは、倒立顕微鏡による細胞の形態観察とともに発光法によるATP測定により細胞の増殖性を評価した。ゲルシート足場を用いた場合は、静止状態で培養したこと以外については、培養方法は上記マイクロカプセル足場の場合と同様である。

(4) 紫外線照射ゲル足場と培養細胞との接着の観察
シート状紫外線照射ゼラチンゲル足場と培養細胞との接着の様子を調べるためにSEMおよびTEMの観察を行った。

(5) 混合培養、薬剤併用効果
WI-38とWI-38-VA-13が共存する場合のそれぞれの細胞の増殖性の違いを調べるためにこれら2種の細胞の混合比を変えて混合培養を行った。また、細胞と足場の相互作用に対する薬剤の併用効果を調べるために、分化度の異なる胃癌細胞をゲルシート上で培養する際に、抗がん剤5-Fluorouracil (5-FU)または、シスプラチン(CDDP)を含有させた培養液を用いた実験を行った。また、これらの抗がん剤をゲルシート足場に含ませた場合、培養液に含ませた場合、ゲルシート足場と培養液の両方に含ませた場合について調べた。

4. 研究成果

(1) 紫外線照射ゼラチンゲル足場の接着・増殖に関する基礎研究

①マイクロカプセル足場とゲルシート足場との比較

図2はゲルシート足場上での正常繊維芽細胞WI-38およびがん化した細胞WI-38-VA-13の接着・増殖を示す顕微鏡写真である。WI-38は足場調製時の紫外線照射時間によらず、良く接着増殖している。一方、WI-38-VA-13は足場調製時の紫外線照射時間が短いときには広い接着面積で足場に接着しているが、紫外線照射時間が長くなると接着面積が小さくなりスフェロイド状に接着していることがわかる。すなわち、ゼラチンゲルへの紫外線照射は、実験で用いた紫外線照射時間の範囲では、足場に対する接着性のがん細胞に対してだけ減少させる傾向を持つことがわかった。この点においてはマイクロカプセル足場における細胞培養[3]と同様の傾向を示す。一方で、定量的には、ゲルシート足場ではマイクロカプセル足場と異なり、がん細胞がまったく接着しないという条件は見出されなかった。マイクロカプセル足場を用いた懸濁培養において、攪拌速度依存性を調べた実験では、攪拌速度が小さくなると接着が見られるようになったことから、上記の違いの原因の一つとして、懸濁培養における細胞に対するずり応力が紫外線照射によって足場との接着性が弱くなっていたがん細胞の接着性をさらに抑制したことが考えられる。

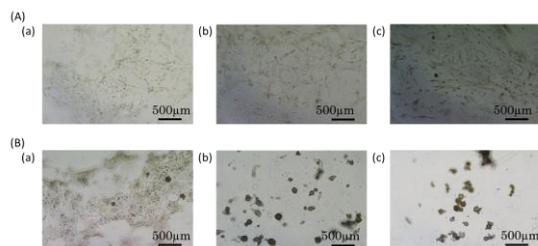


図2 繊維芽細胞(WI-38) (A) とがん化した細胞(WI-38-VA-13) (B) の光学顕微鏡写真。紫外線照射時間は $t_{UV} = 30\text{min}$ (a), 40min (b) 400min (c) である。

②足場の架橋密度

紫外線照射ゼラチンゲル足場はマイクロカプセルの場合もゲルシートの場合もがん細胞の接着性を抑制することがわかったので、足場の物理的性質や接着表面構造を調べるための実験を実験の比較的容易なゲルシートを用いて行った。

ゲルシートのヤング率と膨潤比の測定から架橋密度を求めた。架橋密度は温度変化により水素結合量が変化することに伴い温度とともに減少する変化を示した。また、生理的温度では紫外線照射量とゼラチン濃度により平均孔径を制御できることを確かめた。ま

た、架橋密度は紫外線照射時間 t_{UV} とともに単調に増加し、平均メッシュサイズは培養実験において用いた $t_{UV}=30 \text{ min}$ のシートではおよそ $0.15 \mu\text{m}$ と見積もられた。この値はがん細胞の仮足がメッシュに絡まり引っかかることによって接着・増殖が抑制されるとされるメッシュサイズのオーダーよりかなり小さい。メッシュサイズには分布があるためこの結果からだけではこれ以上の考察は難しいが、がん細胞の増殖抑制の原因としてメッシュサイズ以外の原因による可能性が示唆された。

③足場の架橋法による接着・増殖性の違い
CC ゲルに紫外線照射すると線維芽細胞の接着・増殖の変化はがん化した細胞でのみ見られる点でゼラチンゲルの場合と同様であり、紫外線による改質ががん細胞の接着抑制に重要であることを示唆した。一方、TG ゲルにおいてゼラチン濃度が大きいとき（架橋密度が大きいとき）にがん細胞の接着・増殖性が大きくなったことは、UV ゲルの場合と比較すると、がん細胞の接着・増殖抑制が架橋密度の変化だけでは説明できないことを示唆している。

④細胞と足場の接着界面の構造
正常な線維芽細胞 WI-38 とがん化した細胞 WI-38-VA-13 に対する電子顕微鏡観察では、細胞間の接着斑や足場と接着している細胞膜付近の細胞骨格の構造において違いが見られることが分かった（図 3、4）。すなわち、WI-38 は細胞骨格が発達しゲル足場の中に食い込んで足場を歪ませているのが観察されたが、WI-38-VA-13 はゲル足場との接着界面において細胞内にアクチン線維が観察されるもののゲル足場の構造はそのままであった。

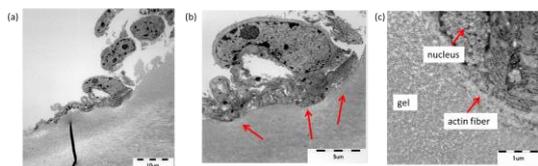


図3 正常線維芽細胞WI-38の足場接着面付近における透過電子顕微鏡写真。倍率は1760 (a), 4780 (b), 19000(c)である。矢印で示された点において細胞がゲル中に食い込んでいる様子が見られる。

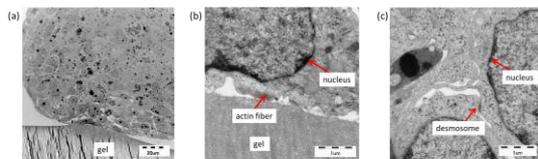


図4 がん化した線維芽細胞WI-38-VA-13の足場接着面付近 (a),(b)と細胞凝集体内部(c)における透過電子顕微鏡写真。倍率は598 (a), 19000 (b), 19000(c)である。

以上の実験結果と線維芽細胞のタンパク発現量の知見より、紫外線照射足場上でのがん

化した線維芽細胞の接着抑制効果は次のように考えることができるかもしれない。WI-38-VA-13 は、フィブロネクチンの分泌量が少ない一方、細胞同士の結合によってスフェロイドを形成して足場なしに増殖することができる（足場非依存性）。接着部位がたくさんある足場には接着して増殖するが、接着部位が少ない場合はスフェロイドを作って増殖する。そのため、接着部位が少なくなっている紫外線照射足場には接着せず、スフェロイドを作って増殖する。それに対して、WI-38 はフィブロネクチンを多く分泌し、フィブロネクチンが足場と細胞を、インテグリンを介して結合させる。したがって、フィブロネクチンが結合できる場所がない浮遊系シャーレには接着できないが、接着部位は相対的に少なくなっているがある程度の接着部位が残っている紫外線照射足場上でも接着し増殖する。

(2) 応用技術開発のための実験研究

①マイクロカプセルのクリーム化

マイクロカプセルをいくつかの高粘度溶媒および界面活性剤と混合することによりクリーム状の懸濁液を調製することができた。また、この懸濁液を用いた線維芽細胞の細胞培養を試みた。実験の結果、線維芽細胞のマイクロカプセル足場への接着および増殖速度はクリーム状懸濁液と培地との混合比に依存して大きく変化するが制御可能であることが分かった。

②分化度の異なる胃がん細胞を用いた細胞培養

腹膜播種性転移を引き起こす細胞として胃がん細胞を選択し、異なる分化度を持つ胃がん細胞に対して紫外線照射ゼラチンマイクロカプセル足場およびゲルシート足場上での細胞培養を行った。低分化型 MKN45、中分化型 MKN74、高分化型 MKN7 は、紫外線照射時間に関わらずシートへの細胞の接着が少なく、ほとんどの細胞はスフェロイドを形成し、培養液中で浮遊した。但し、低分化型と中分化型では紫外線照射時間が短いとゲルシートへの細胞接着が多くなる傾向が見られた。したがって、胃がん細胞の分化度が低いほど、すなわち、悪性度が高いほど足場に対する接着性が悪いことが示唆された。また、マイクロカプセル作製時の紫外線照射量が大きいほどこの傾向が大きいことが分かった。したがって、がん細胞の悪性化により紫外線照射ゼラチンゲル足場との接着感受性に変化があることが示唆された。

③混合培養・薬剤併用効果

WI-38 と WI-38-VA-13 の混合培養では、WI-38-VA-13 の混合割合が 1/20 以下の極端に小さい場合のみ接着・増殖性の評価が可能であることがわかった。このことは、WI-38-VA-13 が持つ短い細胞周期によるも

のと思われる。2種類の抗がん剤をゲルシート足場と培養液に含ませた実験では、ゲルシートと培養液の両方に2種の抗がん剤 5-FU と CDDP を併用したときにもっとも大きな抑制効果が見られた。

②、③より、線維芽細胞に関して得られた知見が胃がん細胞にも適用できる可能性を示すとともに、具体的な応用においてがん細胞の数密度が重要であるとともに薬剤併用の可能性が示唆された。

<引用文献>

① M. Koike, K. Kobayashi, S. Tanaka, A. Harano, T. Yamamoto and T. Dobashi, Development of Cell Culture Scaffold Composed of Microcapsule: Determination of Preparation Condition, Trans. MRS-J, 31, 823-825 (2006).

② T. Yamamoto, M. Koike, T. Dobashi, Melting and Swelling Behaviors of UV-irradiated Gelatin Gel Microcapsules, Langmuir, 23, 8531-8537 (2007).

③ T. Dobashi, M. Koike, K. Kobayashi, Y. Maki, T. Yamamoto and S. Tanaka, An application of microcapsules having enzyme-degradable gel membrane to cell culture, Progress in Colloid and Polymer Science, 136, 149-153 (2009).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

① Yoshinori Takagi, Susumu Tanaka, Syo Tomita, Shuri Akiyama, Yasuyuki Maki, Takao Yamamoto, Masumi Uehara, and Toshiaki Dobashi, Preparation of Gelatin Scaffold and Fibroblast Cell Culture, J. Biorheol. (2017) in press. 査読あり

〔学会発表〕(計6件)

① 土橋敏明、マイクロカプセルの科学—接触・拡散による壁膜ゲル形成、物質放出、吸着のダイナミクス—、第18回レオロジー・フォーラム、2016年10月28日、大阪大学、大阪

② 吉田啓恭、高木宣祥、榎靖幸、土橋敏明、田中進、紫外線照射ゼラチンゲル足場における分化度の異なる胃がん細胞の接着・増殖性、第39回バイオレオロジー学会年会、2016年6月18日、東海大学校友会館、東京

③ 高木 宣祥、富田 翔、嶋田 美沙、榎 靖幸、山本隆夫、土橋 敏明、田中 進、細胞培養可能なゼラチンゲルシートの作製とその性質、第38回バイオレオロジー学会年会、2015年6月6日、学術情報センター、東京

④ 富田翔、高木宣祥、榎靖幸、山本隆夫、土橋敏明、田中進、ゼラチンゲル足場の力学的性質、第62回レオロジー討論会、2014年10月15日、福井市地域交流プラザ、福井

⑤ 富田翔、高木宣祥、小池迪瑠、小林健太郎、

山本隆夫、土橋敏明、田中進、細胞選択性マイクロカプセル足場の作製と細胞培養、第37回バイオレオロジー学会年会、2014年6月6日、大宮ソニックシティ、さいたま

⑥ 高木宣祥、富田翔、山本隆夫、土橋敏明、田中進、細胞培養可能なゼラチンゲルシートの作製、第37回バイオレオロジー学会年会、2014年6月6日、大宮ソニックシティ、さいたま

〔図書〕(計1件)

N. Tomita and T. Dobashi, Biorheological aspect of microcapsules in Nano/Micro Science and Technology in Biorheology, 239-259, Ed. by R. Kita and T. Dobashi, Springer, 2015, pp 239-260.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

土橋 敏明 (DOBASHI, Toshiaki)
群馬大学・大学院理工学府・教授
研究者番号：30155626

(2) 研究分担者

田中 進 (TANAKA, Susumu)
高崎健康福祉大学・健康福祉学部・教授
研究者番号：70348142

榎 靖幸 (MAKI, Yasuyuki)

群馬大学・大学院理工学府・助教
研究者番号：50400776