

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：32686

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05236

研究課題名（和文）ナノ薬剤評価用マイクロ腫瘍組織モデルの開発

研究課題名（英文）Microfluidic tumor model for nanomedicine development

研究代表者

佐々木 直樹（Sasaki, Naoki）

立教大学・理学部・准教授

研究者番号：30462691

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：抗腫瘍剤などをナノ粒子に担持したナノ薬剤は、腫瘍選択的な薬物送達が可能とされているが、臨床応用は進んでいない。本研究ではヒトの腫瘍組織の構造や特性を反映したマイクロ腫瘍組織モデルを構築し、ナノ薬剤評価に応用することを目的とした。血管内皮細胞や腫瘍細胞、マクロファージ等をデバイスに組み込み、ナノ粒子の透過性や細胞への取り込みを評価した。顕微観察に適したマイクロ流体デバイスを作製し、種々の条件がナノ粒子の動態に与える影響を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本成果は、ヒトの体内でナノ薬剤がどのように動いて細胞に取り込まれるのかなど、ヒトにおけるナノ薬剤の動態予測につながるという学術的意義を有する。加えて、一般に多くの時間と費用を要する新薬開発において、動物実験を部分的に代替することでこれらの問題を解決するという社会的意義を有する。ヒトの腫瘍組織の構造や特性を反映したモデルで評価することで、新薬開発の成功率の向上も見込める。

研究成果の概要（英文）：Nanomedicines are believed to be capable of tumor-selective drug delivery, but their clinical application has not progressed. In this study, we aimed to construct a microfluidic tumor model that reflects the structure and characteristics of human tumor tissue and apply it to the evaluation of nanomedicines. Vascular endothelial cells, tumor cells, and macrophages were incorporated into the device, and the permeability and cellular uptake of nanoparticles were evaluated. Microfluidic devices suitable for microscopic observation were fabricated, and the effects of various conditions on the dynamics of nanoparticles were clarified.

研究分野：マイクロ・ナノ分析化学

キーワード：ナノ薬剤 腫瘍 マイクロ流体デバイス

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ナノ薬剤は抗腫瘍剤や造影剤などの薬物をナノ粒子に担持したものである。そのサイズは典型的には 100 nm 前後であり、いわゆる Enhanced permeability and retention (EPR) 効果により、ナノ薬剤は腫瘍血管壁の孔から血管外に漏出し、その結果として腫瘍選択的な薬物送達が可能とされている。リポソーム製剤のように実用化されているものもあるが、総じてみれば、ナノ薬剤の臨床応用は進んでいない。その一因として、実験動物とヒトでは腫瘍組織の構造が異なるため、動物実験の結果が必ずしもヒトに当てはまらない可能性が指摘されている(兵頭ら, Drug Delivery Systems 2017)。従って、ヒトにおけるナノ薬剤の動態を予測する手法が必要とされている。

近年、微細加工技術で作製したマイクロ流体デバイス上に、腫瘍組織のモデルを構築する研究が盛んに取り組みられている。マイクロ流体デバイスは、数 cm 角の基板に  $\mu\text{m}$  スケールの流路を配した実験器具であり、ここに種々の細胞や生体材料を、生体内の状況を考慮した上で組み込むことができる。具体的には、腫瘍細胞やその周囲の間質、さらには血管に相当する要素を組み込んだモデルがこれまでに開発されてきている。このようなモデルをナノ薬剤評価に応用する研究も多く、例えばナノ粒子の腫瘍細胞塊への取り込みや、内皮細胞層の透過などが調べられてきた。しかしながら、ナノ薬剤が効きにくい腫瘍において特に重要となる、血管を取り巻く間質や、腫瘍随伴マクロファージの作用がナノ薬剤の腫瘍への送達に与える影響は不明である。本研究では、これらに相当する要素をモデルに組み込むことで、腫瘍組織におけるナノ薬剤の動態を明らかにし、高性能なナノ薬剤の開発につながる知見を得られると考えた。

### 2. 研究の目的

本研究では、ヒトの腫瘍組織の構造や特性を反映したマイクロ腫瘍組織モデルを構築し、ナノ薬剤評価に応用することを目的とした。具体的には、細胞の培養状況とナノ粒子の動態を同一デバイスで評価するために、2 方向から観察可能な多孔膜集積マイクロ流体デバイスを作製した。腫瘍組織を構成する血管内皮細胞や腫瘍細胞、マクロファージ、さらには間質を構成するフィブリンやコラーゲンをデバイスに組み込み、市販のナノ粒子や研究分担者の開発したナノ粒子をデバイスに導入し、ナノ粒子の透過性や細胞への取り込みを評価した。

### 3. 研究の方法

#### (1) マイクロ腫瘍組織モデルの構築

マイクロ流体デバイスの素材にはポリジメチルシロキサン (PDMS) を用いた。研究代表者の既報(分析化学, 67(7), 379-386 (2018))に従ってアクリル板で鋳型を作製し、これを PDMS でかたどって、マイクロ流路パターンを有する基板を作製した。これをパターンを有さない別の基板と接合し、流路を区切るように、顕微鏡下で基板に対して垂直に切り込みを入れた。この切り込みに、市販のセルカルチャーインサートから切り出したトラックエッチ多孔膜の切片を挟み、基板をベイクして切り込みをふさいだ。多孔膜上に細胞を培養する実験では、膜上の細胞を観察できるように、カバーガラスを小さく切り、未硬化の PDMS を接合層としてデバイスの側面に貼りつけた。基板にあらかじめ開けておいた穴にチューブを差し込み固定することでデバイスを完成させた。

デバイス内に各種の細胞や生体材料を組み込むことでマイクロ腫瘍組織モデルを構築した。腫瘍細胞としてヒト乳癌細胞株 MDA-MB-231 を用いた。腫瘍随伴マクロファージのモデルとしてヒト単球細胞株 U937 を M2 型マクロファージに分化誘導して用いることとし、ヒト単球細胞株 U937 をホルボール 12-ミリステート 13-アセテート (PMA) で処理し、そののちにインターロイキン 4 (IL4) を含む培地中で培養して、M2 型マクロファージを得た。血管内皮細胞はヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を用いた。腫瘍間質のモデルとしてフィブリンもしくはコラーゲンをを用いた。

血管内皮細胞を培養する流路にフィブロネクチン溶液 ( $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) を満たし、 $37^\circ\text{C}$ 、 $5\% \text{CO}_2$  のインキュベーター内で 30 分インキュベートした。培地で流路を洗浄したのち、HUVEC の懸濁液 ( $1 \times 10^7 \text{ cells}/\text{mL}$ ) を流路に導入した。流路内の多孔膜が懸濁液の下部に位置する向きで、インキュベーター内で 1 時間インキュベートしたのち、培地を導入して未接着の細胞を除去し、2 日間培養した。その後、カルセイン AM とエチジウムホモダイマー-1 を用いて生細胞と死細胞をそれぞれ染色し、蛍光顕微鏡で観察した。

#### (2) ナノ粒子の透過性評価

この実験では、上記(1)の手法で基板に切り込みを 2ヶ所入れ、孔径の異なる多孔膜 ( $3 \mu\text{m}$  および  $0.4 \mu\text{m}$ ) の切片をそれぞれ挟み込み、膜で区切られた 3 本の流路を有するデバイスを作製した。腫瘍間質のモデルとして、新生血管の周囲に形成されるフィブリンゲルを選定し、この元となるフィブリンとトロポニン B の溶液を混合して流路に充填した。この際、形成されたゲルを蛍光観察できるように、蛍光標識フィブリンを混ぜておいた。溶液を充填した流路の出入口をふさいだのち、インキュベーター内で 1 時間インキュベートした。これを蛍光顕微鏡で

観察し、フィブリンゲルが形成されていることを確認した。その後、ゲルを形成した流路に隣接する一方の流路に界面活性剤入りのリン酸緩衝生理食塩水を満たし、もう一方の流路に 0.5  $\mu\text{L}/\text{min}$  で蛍光標識ポリスチレンナノ粒子 ( 粒径 100 nm ) の懸濁液を送液して、一定時間ごとに蛍光像を撮影した。懸濁液の希釈倍率は 2000 倍から 10000 倍の範囲で検討した。研究代表者の既報 ( PLOS ONE, 10(9), e0137301 (2015) ) を基に蛍光像から透過係数を算出し、各条件におけるフィブリンゲル内への透過性を定量評価した。さらに、各条件における透過係数に対して t 検定により有意差を評価した。

ナノ粒子の弾性の影響を検討する実験では、デバイスは上記(1)と同様のものを用いた。硬い粒子として市販の蛍光標識ポリスチレン粒子 ( 粒径 100 nm ) 柔らかい粒子として研究分担者の作製した蛍光標識 PICsome ( 粒径 144 nm ) を用いた。透過性試験及び解析は前段落と同様に行った。

### (3) ナノ粒子の細胞取り込みの評価

抗癌ナノ粒子として市販のドキソルピシン (Dox) 内包リポソームを用いた。MDA-MB-231 と I 型コラーゲンを混合して流路に導入したのち、37 °C でインキュベートしてコラーゲンをゲル化させた。Dox 内包リポソームを培地と混合して導入し、一定時間ごとに Dox の蛍光を顕微鏡観察した。細胞に取り込まれた Dox 由来の蛍光の輝度を蛍光像から求め、周囲の蛍光輝度で規格化し、これを Dox の取り込み量に相当するものとして評価に用いた。M2 型マクロファージでも同様の実験を行った。

## 4. 研究成果

### (1) マイクロ腫瘍組織モデルの構築

本研究で作製したデバイスの例を図 1A, B に示す。基板に対して垂直に膜が組み込まれており ( 図 1A )、側面のカバーガラス越しにこの膜を視認できていることがわかる ( 図 1B )。培養後の血管内皮細胞はほぼ全て生存しており ( 図 1C )、このデバイス内で血管内皮細胞を培養して血管壁様の構造を構築できることが示された。分化誘導実験においては、PMA および IL4 刺激により細胞の形態が浮遊細胞様から接着細胞様へ変化したこと、および蛍光免疫染色により、目的の M2 型マクロファージを得られていることを確認した。

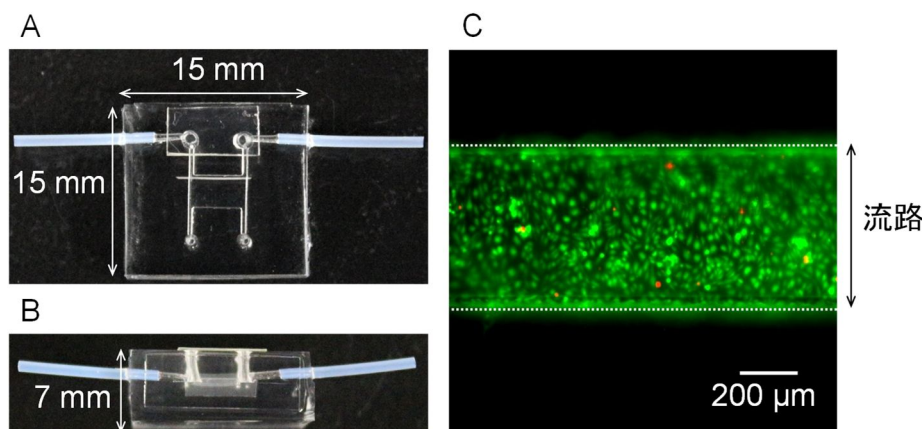


図 1 (A, B) 本研究で作製したマイクロ流体デバイスの例。(A) 上からの写真。(B) 横からの写真。(C) デバイス内の膜上で培養された血管内皮細胞。緑は生細胞、赤は死細胞をそれぞれ表す。

### (2) ナノ粒子の透過性評価

いずれの条件においても、ゲルを形成した流路から蛍光が観察された。本実験ではナノ粒子が多孔膜の孔を通過してゲル中に透過していく。従って、透過係数はナノ粒子の粒径や多孔膜の孔径、ゲルのポアサイズ等には依存すると考えられるが、希釈倍率の影響は定かではなかった。本研究で検討したところ、希釈倍率が 3000 倍よりも小さい条件において、透過係数が有意に減少することがわかった。この原因として、粒子濃度が高すぎるため、ナノ粒子が多孔膜の孔の近傍に蓄積し、ゲル内への透過を妨げている可能性が考えられる。よって、粒子濃度が高いほど蛍光観察はしやすくなるものの、透過係数への影響を考慮すると、希釈倍率を一定値以上にする必要があることが示された。

ナノ粒子の弾性の影響を検討した結果を図 2 に示す。蛍光像 ( 図 2A ) から、直径 100 nm の硬い微粒子では 30 分で透過があまり見られないものの、直径 144 nm の柔らかい微粒子は明らかな透過を示した。蛍光輝度を基に透過係数を求めるためのタイムコース ( 図 2B ) を作成したところ、これらの結果には明らかな差が認められた。タイムコースの傾きは透過係数に相当し、その値はポリスチレン微粒子では  $2.0 \times 10^{-5} \text{ cm/s}$ 、PICsome では  $1.2 \times 10^{-4} \text{ cm/s}$  と求められた。よって、粒子の弾性率が疑似間質部への透過量に影響を及ぼすことが示された。

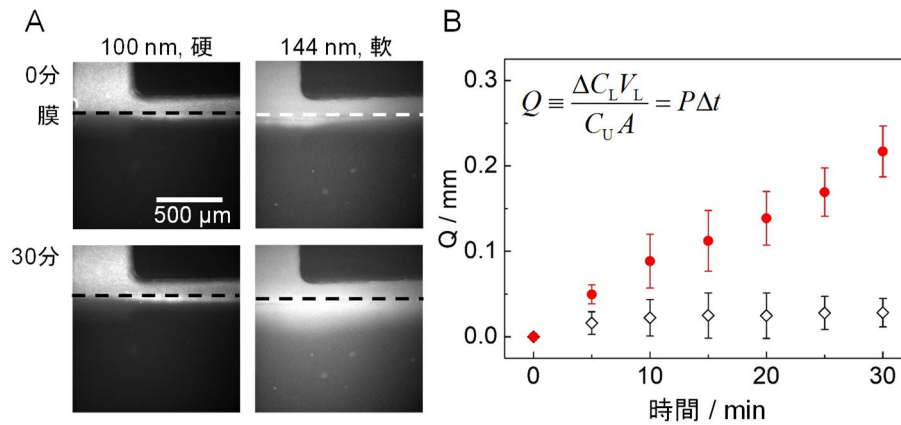


図2 ナノ粒子の弾性の影響 . (A)透過性試験で得られた蛍光像 . (B)透過係数を求めるためのタイムコース .

### (3)ナノ粒子の細胞取り込みの評価

MDA-MB-231 を用いた実験では、コラーゲン濃度 2 mg/mL までは、コラーゲン濃度の増加に伴い規格化輝度が減少した。これはコラーゲンの濃度増加に伴って、ゲルの孔径が小さくなり、Dox の拡散が抑制されたためと考えられる。対してコラーゲン濃度 2 mg/mL 以上では、コラーゲン濃度の増加と共に規格化輝度も増加した。これは細胞の足場となるコラーゲンが増えたことで、MDA-MB-231 の増殖に適した環境となり、より多くの Dox を取り込んだためと考えられる。このことから、ナノ粒子の癌細胞への取り込み評価では、コラーゲンゲル中でのナノ粒子の拡散と癌細胞の増殖の両方を考慮する必要があることが分かった。

M2 型マクロファージを用いた実験では、コラーゲン濃度 1.2 ~ 3.0 mg/mL の範囲でナノ粒子の取り込みを観察できた。取り込みはコラーゲン濃度と培養時間の両方の影響を受け、培養時間 26 時間ではコラーゲン濃度が高いほど取り込み量も増加した。これは細胞の足場が増加し、ナノ粒子の取り込み活性が向上している可能性を示している。

以上のように、本研究では、ナノ粒子の透過や細胞取り込みに種々の要素が影響を及ぼすことを明らかにできた。本研究は今後、ヒト腫瘍細胞に効果的に到達するナノ薬剤の条件を明らかにすることにつながるものと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 佐々木直樹
2. 発表標題 多孔膜垂直配置マイクロ流体デバイス
3. 学会等名 令和2年度 分析イノベーション交流会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Mayu Watanabe, Yumi Moriya, Hiroaki Matsuba, Akihiro Kishimura, Yoshiki Katayama, Naoki Sasaki
2. 発表標題 Extravasation of soft nanoparticles simulated on an easy-to-observe membrane-integrated microfluidic device
3. 学会等名 The 23rd International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Marika Sugimoto, Keisuke Yanagisawa, Naoki Sasaki
2. 発表標題 A two-way membrane-integrated microfluidic device for permeation assays
3. 学会等名 The 23rd International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐々木直樹
2. 発表標題 Organ-on-a-chipによる臓器機能再現
3. 学会等名 第32回バイオメディカル分析科学シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	岸村 顕広  (Kishimura Akihiro)  (70422326)	九州大学・工学研究院・准教授    (17102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------