

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年6月3日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659283

研究課題名（和文） 細胞個性に立脚したターゲティング型細胞治療システムの開発

研究課題名（英文） Development of targeted cell therapeutic systems based on cell characteristics

研究代表者

西川 元也（NISHIKAWA MAKIYA）

京都大学・大学院薬学研究科・准教授

研究者番号：40273437

研究成果の概要（和文）：細胞治療の実現を目的に、細胞毎に大きく異なる個性に注目し、「細胞個性に立脚したターゲティング型細胞治療システム」の開発に取り組んだ。細胞を生体に投与したときの生存期間および生理活性を最大化する方法として、細胞のスフェロイド化技術の利用を検討した。ポリジメチルシロキサン製マイクロポケットを用いることで均一なサイズの細胞スフェロイドが得られたが、接着性の高い細胞ではマイクロポケット表面への吸着によりスフェロイド形成が阻害された。この細胞接着は、ポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)でポケット表面をコーティングすることで抑制可能であり、その結果、検討したすべての細胞種において細胞スフェロイドが作製可能であった。そこで、作製したスフェロイドを利用した疾患治療の可能性について、インスリン産生細胞である NIT-1 を用いて検証したところ、細胞懸濁液と比較して NIT-1 スフェロイドが細胞の生存率を改善し、優れた血糖値抑制効果を示すことを見出した。

研究成果の概要（英文）：To realized cell therapy, we tried to develop “targeted cell therapeutic systems based on cell characteristics”. We examined the use of multicellular spheroids as a method to maximize the cell survival and functions after in vivo application. Spheroids with controlled size were obtained by using polydimethylsiloxane-based micro-pockets, but cell adhesion to the micro-pocket surface prevented some types of cells from spheroid formation. Coating the micro-pockets with poly(N-isopropylacrylamide) solved this problem, and multicellular spheroids were successfully prepared using all the cell types used. Then, therapeutic potential of multicellular spheroids was examined in diabetic model mice using insulin-producing NIT-1 cells. NIT-1 spheroids showed prolonged survival of the mice and high activity to reduce blood glucose level compared with NIT-1 cell suspension.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・応用薬理学

キーワード：ドラッグデリバリー

1. 研究開始当初の背景

ヒトをはじめとする多細胞生物では、高度に分化した細胞が「必要なときに、必要なところで、必要なだけ」機能することで、個体の生命維持に重要な役割を果たしている。細胞

培養・分化誘導に関する近年の技術革新に相まって、細胞を利用した疾患治療法に対する期待が飛躍的に高まってはいるが、体外から投与された細胞の体内動態が期待通りでないために、十分な治療効果が得られるには

至っていない。このことは、これまでの医薬品同様、細胞投与による疾患治療においても、「必要ときに、必要なところで、必要なだけ」機能させるためのドラッグデリバリーシステム (DDS) の概念に基づいた戦略の重要性を意味する。

申請者らはこれまでに、高分子の動態特性を利用した細胞特異的ターゲティング、新規 *in vivo* 遺伝子治療法の開発と疾患治療への応用、抗原デリバリーによる癌免疫療法など、種々の新規 DDS 開発に取り組んできた。この過程で、細胞の定量的体内動態評価システムの開発にも成功し、細胞の体内動態追跡を可能にした。以上の検討結果をもとに、細胞に対しても DDS を適用することで、その体内動態の精密な制御が可能になり、細胞を利用した疾患治療の有効性を飛躍的に増大できるのではないかと考えるに至った。

2. 研究の目的

細胞治療の革新的発展に向けて、生存期間及び体内分布等の体内動態を厳密に制御したターゲティング型細胞治療システムの開発を試みる。細胞毎に大きく異なる個性に注目するとともに、細胞を生体に投与したときの生存期間および生理活性を最大化する方法として、細胞のスフェロイド化技術の利用を検討した。

3. 研究の方法

(1) 細胞スフェロイドの調製

個性の異なる細胞として、マウス線維芽細胞株 NIH3T3、マウスインスリノーマ株 NIT-1、マウス血管内皮細胞株 MAEC、マウス結腸癌細胞株 colon26、マウスメラノーマ株 B16-BL6、マウスマクロファージ様細胞株 RAW264.7 をモデル細胞として選択し、細胞スフェロイドの調製に用いた。細胞スフェロイドの調製には、micromolding 技術を用いて作製した均一なサイズのポリジメチルシロキサン (PDMS) 製マイクロポケットを用いた。必要に応じて、ポリニップラム (PNIPAAm) で PDMS 表面をコーティングすることで、マイクロポケットへの細胞接着を抑制した。

(2) 細胞スフェロイドの物性評価

顕微鏡観察により、細胞スフェロイドの形状およびサイズを評価した。また、スフェロイドを構成する細胞の細胞数を計数した。このとき、トリパンブルーを用いることで細胞の生存率を併せて評価した。

(3) 癌細胞スフェロイドの肺転移形成

B16-BL6 細胞または colon26 細胞を静脈内移植したときの肺表面に形成される転移結節数を指標に、生存や接着、増殖等の癌細胞機能に及ぼすスフェロイド化の影響を評価

した。同数の癌細胞懸濁液あるいは癌細胞スフェロイドをマウスに尾静脈内投与し、一定期間経過後にマウス肺を摘出し、表面の転移結節数を計測した。

(4) インスリン産生細胞スフェロイドによる血糖降下作用

インスリン産生細胞である NIT-1 をマウスに投与したときの血糖値を指標に、スフェロイド化による細胞機能向上を評価した。予め、マウスにストプレトゾトシン (STZ) を投与することで、1 型糖尿病モデルマウスを作製した。このマウスの腎被膜下に、NIT-1 懸濁細胞あるいは NIT-1 スフェロイドを移植し、経時的にマウス血糖値を測定した。耐糖能を評価するために、移植 28 日目の時点でグルコースを腹腔内投与し、血糖値を測定した。別途、carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) で蛍光標識した NIT-1 細胞を用い、マウス移植後の細胞生存期間に及ぼすスフェロイド化の影響を評価した。

4. 研究成果

(1) 細胞スフェロイドの調製

直径が 200 μ m から 400 μ m までの PDMS 製マイクロポケットを用いて細胞スフェロイドを調製した結果、接着性の高い RAW264.7 細胞や NIH3T3 細胞を含む複数の細胞種でマイクロポケットへの細胞接着が認められた。このように細胞がポケットに接着した場合には、均一なサイズの細胞スフェロイドを回収することが困難であった。そこで、PDMS 製マイクロポケット表面を PNIPAAm でコーティングすることで、細胞接着の抑制を試みた。その結果、PNIPAAm コーティングにより、細胞接着が効率よく抑制可能であり、検討に用いた全ての細胞種で均一なサイズの細胞スフェロイドが得られた。

(2) 細胞スフェロイドの物性評価

上記で開発した方法を用いて調製した各種細胞スフェロイドの物性を評価した。いずれの場合にも、マイクロポケットのサイズに依存したサイズの細胞スフェロイドが得られることが示された。その一方で、他の細胞種と比較して、colon26 細胞は凝集しやすく、比較的小さいサイズのスフェロイドを形成することも明らかとなった。スフェロイド当たりの細胞数は、スフェロイドサイズに依存して増大し、最大のもので 15,000 個程度の細胞からなる直径 400 μ m のスフェロイドが調製可能であった。別途測定したスフェロイド構成細胞の viability はいずれの場合にも 90% 以上と高いことが明らかとなった。

(3) 癌細胞スフェロイドの肺転移形成

移植後の細胞生存率を評価するために、

B16-BL6 細胞または colon26 細胞を尾静脈内に移植したときの肺転移結節数を測定した。これらの癌細胞を尾静脈内に移植した場合には、ほぼ全ての細胞が一旦肺の毛細血管に補足され、その後、数%の細胞が長期間残存し増殖することで、転移結節が形成されることが示されている。マウス当たり 50,000 個の colon26 細胞を移植し、7 日後に肺表面の結節数を評価したところ、懸濁細胞の場合にはほとんど結節が認められなかったのに対し、colon26 スフェロイドを移植した場合には全てのマウスにおいて明らかな結節が認められた。また、直径約 200 μ m と移植に用いた最大の細胞スフェロイドを移植した場合には、移植スフェロイド数とほぼ同数の結節が認められた。B16-BL6 細胞を用いた場合にも同様の結果が得られた。以上より、細胞をスフェロイド化することで、生体投与後の細胞生存率を向上できる可能性が示された。

(4) インスリン産生細胞スフェロイドによる血糖降下作用

インスリンを産生する NIT-1 細胞スフェロイドによる血糖降下作用について、STZ 処理糖尿病モデルマウスを用いて評価した。臍島を用いた移植モデルでの検討結果を参考に、細胞の移植部位には腎被膜下を選択した。STZ 処理により血糖値が 600mg/dl 以上となったマウスに対して、1,100,000 個の NIT-1 細胞を懸濁状態あるいはスフェロイドとして投与したところ、NIT-1 スフェロイド投与群においてのみ血糖値の低下が認められた。そこで、移植 28 日目の時点で耐糖能テストを行ったところ、NIT-1 スフェロイド投与群では、STZ 未処理マウスと同等の血糖値低下が観察されたことから、移植した NIT-1 細胞がインスリンを分泌することで血糖値がコントロールされていることが強く示唆された。そこで、スフェロイド化による活性の増強が、細胞の生存率の改善によるかを評価するために、蛍光標識 NIT-1 細胞を用いて検討したところ、懸濁細胞と比較して NIT-1 スフェロイドが長期間移植部位に存在することが示された。

以上、細胞スフェロイドを作製することで、細胞を生体に投与したときの生存期間および生理活性を改善可能であることを見出した。また、マイクロポケット表面への吸着やスフェロイド形成が、細胞の種類に依存することを見出すとともに、PNIPAAm でコーティングした PDMS 製マイクロポケットが、全ての細胞種で効率よく細胞スフェロイドを調製するのに適していることを明らかにした。本研究で得られた成果は、今後開発が期待される細胞治療の実現に有益な情報を提供するものと考えられる。

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 2 件)

(1) Shimizu K, Kusamori K, Nishikawa M, Mizuno N, Nishikawa T, Masuzawa A, Katano S, Takahashi Y, Takakura Y, Konishi S. Poly(N-isopropylacrylamide)-coated microwell arrays for construction and recovery of multicellular spheroids. J Biosci Bioeng 2013; 115(6): 695-699. DOI: pii: S1389-1723(12)00531-2.10.1016/j.jbiosc.2012.12.017. 査読有.

(2) 草森浩輔、西川元也、高橋有己、高倉喜信. 細胞スフェロイド化技術の開発と細胞治療への応用. Drug Delivery System 2013; 28: 45-53. 査読無.

[学会発表] (計 6 件)

(1) Kosuke Kusamori, Makiya Nishikawa, Narumi Mizuno, Tomoko Nishikawa, Kazunori Shimizu, Satoshi Konishi, Yuki Takahashi, Yoshinobu Takakura. Development of Uniformly Sized Insulin-Producing Multicellular Spheroids for the Treatment of Type 1 Diabetes. 第 6 回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム (京都大学薬学部、京都府)、2012 年 11 月 23 日.

(2) 草森浩輔、西川元也、高橋有己、山添紗有美、上杉志成、高倉喜信. 細胞接着を促進する合成低分子化合物 adhesamine 誘導体の利用による細胞治療効果の増強. 第 34 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム (京都大学薬学部、京都府)、2012 年 11 月 15 日.

(3) 舩澤 暁、西川元也、草森浩輔、水野成美、清水一憲、小西 聡、高橋有己、高倉喜信. ポリ-N-イソプロピルアクリルアミド被覆ポリジメチルシロキサン基板を用いた細胞スフェロイドの作製. 日本薬剤学会第 27 年会 (神戸国際会議場、兵庫県)、2012 年 5 月 24 日.

(4) 草森浩輔、西川元也、水野成美、清水一憲、小西 聡、高橋有己、高倉喜信. 1 型糖尿病治療を目的とした β 細胞スフェロイドの作製. 日本薬剤学会第 27 年会 (神戸国際会議場、兵庫県)、2012 年 5 月 24 日.

(5) 草森浩輔、西川元也、水野成美、清水一憲、小西 聡、豊田健太郎、稲垣暢也、高橋有己、高倉喜信. ポリジメチルシロキサン製マイクロポケットを利用した細胞スフェロイドの作製. 日本薬学会第 132 年会 (北海道大学、北海道)、2012 年 3 月 30 日.

(6) 草森浩輔、西川元也、高橋有己、山添紗有美、上杉志成、高倉喜信. 細胞機能促進化合物の利用による骨髄由来細胞の皮膚損傷治療効果の増強. 日本薬剤学会第26年会(タワーホール船堀、東京都)、2011年5月29日.

6. 研究組織

(1)研究代表者

西川 元也 (NISHIKAWA MAKIYA)
京都大学・大学院薬学研究科・准教授
研究者番号：40273437

(2)研究分担者

高倉 喜信 (TAKAKURA YOSHINOBU)
京都大学・大学院薬学研究科・教授
研究者番号：30171432
高橋 有己 (TAKAHASHI YUKI)
京都大学・大学院薬学研究科・教授
研究者番号：00547870