

平成 27 年 4 月 27 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670257

研究課題名(和文)混合型細胞スフェロイド化技術を駆使した高機能微小組織移植治療システムの開発

研究課題名(英文) Development of microtissue therapeutic system based on mixed multicellular spheroids

研究代表者

西川 元也 (Nishikawa, Makiya)

京都大学・薬学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：40273437

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：機能細胞としてインスリン分泌活性を有するマウスインスリノーマMIN6を選択し、これに補助細胞として血管内皮細胞株MAECまたは線維芽細胞株NIH3T3を混合することで混合型細胞スフェロイドを作製した。蛍光標識を施した細胞を用いて混合型細胞スフェロイドを作製したところ、MIN6/MAECスフェロイドでは両細胞が比較的混在するのに対し、MIN6/NIH3T3スフェロイドではNIH3T3細胞がスフェロイドの中心に局在し、MIN6細胞がその周囲に位置することが示された。MIN細胞からのインスリン産生は、MIN6/MAECスフェロイドで最も高く、糖尿病モデルマウスへの投与でも優れた血糖降下作用を示した。

研究成果の概要(英文)：To optimize the function of insulin-secreting cells for effective cell-based therapy for type 1 diabetics, we developed mixed multicellular spheroids using insulin-secreting MIN6 cells together with endothelial MAEC cells or with fibroblast NIH3T3 cells. Fluorescence microscopy imaging of spheroids consisting of fluorescently labeled cells showed that MIN6 and MAEC cells almost evenly distributed within the spheroids, whereas in MIN6/NIH3T3 spheroids, NIH3T3 cells were surrounded by MIN6 cells. Insulin secretion from MIN6 cells was upregulated by spheroid formation, and the MIN6/MAEC spheroid more efficiently secreted insulin upon glucose stimulation. Transplantation of the MIN6/MAEC spheroids showed a remarkable reduction in the blood glucose level of diabetic model mice.

研究分野：生物薬剤学

キーワード：細胞治療 スフェロイド 幹細胞 移植

1. 研究開始当初の背景

多細胞生物においては、高度に洗練された機能ユニットである細胞が織りなす細胞間情報伝達が生命の本質とも言える。iPS 細胞の開発に代表されるように、細胞の分化誘導・培養技術の革新により、細胞をそのまま「医薬品」として利用する疾患治療への期待が急速に高まってきた。しかしながら、これまでの研究の多くにおいては、投与された細胞の生理活性が十分に発揮されず、期待された効果は得られていない。その要因としては、懸濁状態の単一細胞が投与部位に局在するという非生理的状态に曝されることや、異物認識あるいはストレスにより細胞死することで、機能細胞が生理活性を十分に発揮できないことが挙げられる。従って、投与する機能細胞周囲の環境を最適化することで細胞の機能を最大限に発揮できれば、細胞投与による治療効果増強が期待される。

申請者らは、レポータータンパク質を安定に発現する細胞株を利用することで、細胞の生体内挙動を定量的に解析可能な評価システムを開発し、細胞の体内動態を支配する因子の解明にいち早く取り組んできた。また、細胞接着を促進する小分子化合物の利用、あるいはマイクロウェルを利用した細胞のスフェロイド(集塊)化による細胞の物理化学的・構造的性質を修飾することで、細胞移植による治療効果が増強可能であることも実証してきた。しかしながら、これらの検討では単一細胞だけを用いていたことから、細胞本来の機能が十分に発揮されていないことが懸念される。従って、複数の細胞種からなる混合型細胞スフェロイドを構築することで、機能細胞にとってより生体に近い環境となり、治療効果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

本研究では、治療目的に投与する細胞(機能細胞)を「補助細胞」と共に混合型細胞スフェロイドとすることで、機能細胞が本来有する機能を最大限に引き出すとともに、生体投与後の機能細胞の生着率の向上・作用発現期間の延長を図る。均一なサイズのマイクロウェルを利用することで複数の細胞種が統合された混合型細胞スフェロイド-微小組織-を開発し、「高機能微小組織移植治療システム」の開発を目指す。細胞治療の革新的発展に向けて、機能細胞の生体投与後の生着率向上ならびに生理活性増強を目的に、機能細胞と補助細胞から構成される混合型細胞スフェロイドを構築し、その機能評価ならびに最適化検討を通じて高機能化細胞スフェロイドを開発する。

3. 研究の方法

(1) 直径の異なるポリジメチルシロキサン(PDMS)製マイクロウェルの作製およびサイ

ズ評価

均一な形状で直径がそれぞれ 360、450、560 μm の突起が整列したプラスチック樹脂製の鑄型に PDMS と触媒の混合液を流し込み、60°C で硬化させることにより 3 種類の PDMS 製マイクロウェルを作製した。得られたマイクロウェルは、直径の小さいものから順に small、medium、large とした。各 PDMS 製マイクロウェルを切断し、断面図を顕微鏡下観察することにより、マイクロウェルの幅および半値幅、深さを計測した。

(2) ポリ-N-イソプロピルアクリルアミド(PNIPAAm) コーティング

温度応答性ポリマーである PNIPAAm をエタノールに溶解した 1% PNIPAAm 溶液を、PDMS 製マイクロウェルに添加し、60°C で乾燥させることでマイクロウェル表面をコーティングした。

(3) 細胞株

マウスインスリン産生膵 β 細胞株 MIN6 細胞は、11% FBS、0.34%炭酸水素ナトリウム、100 units/ml ペニシリン、100 mg/ml ストレプトマイシン、2 mM L-グルタミン、0.1 mM モノチオグリセロールを添加した 4.5 g/L グルコース と L-グルタミンを含有する DMEM 培地で、37°C、5% CO_2 、加湿条件下で培養した。マウス線維芽細胞株 NIH3T3 細胞は、10% FBS、0.11%炭酸水素ナトリウム、100 units/ml ペニシリン、100 mg/ml ストレプトマイシン、2 mM L-グルタミンを添加した DMEM 培地で、37°C、5% CO_2 、加湿条件下で培養した。マウスの大動脈血管内皮細胞株 MAEC 細胞は、5% FBS、0.15%炭酸水素ナトリウム、100 units/ml のペニシリン、100 $\mu\text{g/ml}$ のストレプトマイシンを加えた M199 培地中で、37°C、5% CO_2 、加湿条件下で培養した。

(4) サイズの異なる細胞スフェロイドの作製

PNIPAAm コーティングした各直径の PDMS 製マイクロウェルを 6 well プレート内に設置し、1 ウェル当たり small では 2.5×10^6 個、medium では 5×10^6 個、large では 1×10^7 個の MIN6 細胞を PNIPAAm コーティング PDMS 製マイクロウェルに添加し、 CO_2 インキュベータ内で 72 時間、65 rpm で振盪しながら培養することで MIN6 スフェロイドを作製した。MIN6 細胞と補助細胞(NIH3T3 細胞、MAEC 細胞)との混合型スフェロイドは、スフェロイド中の細胞比率が約 1:1 になるように細胞の混合比を変化させ、上記同様、PNIPAAm コーティング PDMS 製マイクロウェルを用いて作製した。

(5) 細胞スフェロイドのサイズ、細胞数、生存率の測定

各細胞スフェロイドを顕微鏡下観察により長径を測定し、スフェロイド 100 個当たりのヒストグラムを作成した。また、細胞スフ

エロイドをトリプシン処理により分散させ、スフェロイド当たりの細胞数を計数すると共に、トリパンブルー色素排除を指標に生存率を算出した。

(6)混合型細胞スフェロイド中の細胞分布

混合型細胞スフェロイドにおける MIN6 細胞と補助細胞との分布を明らかにするために、MIN6 細胞を CFSE で、補助細胞を DiI で蛍光標識を施した。標識細胞を用いて混合型細胞スフェロイドを作製し、トリプシン処理により分散後、フローサイトメトリー法を用い、細胞分布比率を算出した。また、スフェロイド中の細胞分布を蛍光顕微鏡あるいは Nikon A1 共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

(7)インスリン mRNA 発現の評価

Sepasol-RNA I Super を用いて細胞スフェロイドあるいは単層培養細胞から total RNA を抽出し、ReverTra Ace qPCR RT Kit を用いて逆転写反応を行った。MIN6 細胞からのインスリン放出性の評価を目的に、Ins-1 と Ins-2 を標的遺伝子として選択し、リアルタイム PCR により mRNA 発現を定量し、 β -actin を内部標準遺伝子とした値を算出した。オリゴヌクレオチドプライマーはそれぞれ以下のとおりである。Ins-1、forward (5'-CTGCTGGCCCTGCTTGC-3')、reverse (5'-GGGTCGAGGTGGGCCCTT-3')；Ins-2、forward (5'-CCTGCTGGCCCTGCTCTT-3')、reverse (5'-GGCTGGGTAGTGGTGGGTCTA-3')； β -actin、forward (5'-CATCCGTAAGACCTCTATGCCAAC-3')、reverse (5'-ATGGAGCCACCGATCCACA-3')。

(8)細胞スフェロイドからのインスリン放出

細胞スフェロイドあるいは細胞懸濁液を同数の MIN6 細胞を含むように細胞培養プレートに添加した。培地には 3 mM の glucose を含む Krebs-Ringer Bicarbonate (KRB) 緩衝液を利用し、30 分間培養した。その後、培地を 3 mM または 20 mM glucose 含有 KRB 緩衝液に置換した。30 分後に回収した上清中インスリン量を insulin ELISA キットを用いて測定した。

(9)細胞スフェロイド中のコラーゲン IV 発現

インスリン放出を亢進する細胞外基質コラーゲン IV の発現量を評価した。各細胞スフェロイドにおける mRNA (Col4a1、Col4a2) 発現は、上記と同様にリアルタイム PCR により定量した。オリゴヌクレオチドプライマーはそれぞれ以下のとおりである。Col4a1、forward (5'-ATCCGGCCCTTCATTAGC-3')、reverse (5'-ACTGCGGAATCTGAATGGTC-3')；Col4a2、forward (5'-TAGCTCCTCCGGGATCTACC-3')、reverse (5'-GCTCTCCAAGGTGGGTGTTA-3')； β -actin、forward (5'-CATCCGTAAGACCTCTATGCCAAC-3')、reverse (5'-ATGGAGCCACCGATCCACA-3')。また、コラーゲン IV タンパク質の発現をウェスタンブロットにより評価

した。

(10)1 型糖尿病モデルマウスにおける治療効果

6 週齢雄性 C57BL6/N マウスに対し、ストレプトゾトシンを 135 mg/kg で投与し、1 型糖尿病モデルマウスを作製した。このモデルマウスの腎皮膜下に懸濁 MIN6 細胞、MIN6 スフェロイド、MIN6/MAEC スフェロイドをそれぞれ移植した。その際、MIN6 細胞数がマウス一匹あたり 5×10^4 個となるように設定した。細胞移植後、経日的に血糖値を測定することで、糖尿病に対する治療効果を評価した。

4. 研究成果

(1)混合型細胞スフェロイドの作製

MIN6 細胞単独、あるいは補助細胞として MAEC 細胞または NIH3T3 細胞を含む混合型細胞スフェロイドを作製した。顕微鏡観察の結果、いずれの場合にも均一な大きさの細胞スフェロイドが得られ、各マイクロウェルの直径に依存した大きさの細胞スフェロイドが得られた。また、混合する細胞数を適宜設定することで、MIN6 細胞と補助細胞との存在比率が約 1:1 の混合型細胞スフェロイドが調製可能であった。

(2)混合型細胞スフェロイド中の細胞局在性の評価

MIN6 細胞を CFSE で、補助細胞を DiI で蛍光染色して混合型細胞スフェロイドを作製したところ、MIN6/MAEC スフェロイドでは両細胞が比較的分散して混在するのに対し、MIN6/NIH3T3 スフェロイドでは NIH3T3 細胞がスフェロイドの中心に局在し、MIN6 細胞がその周囲に位置することが示された。その局在を経時的に追跡したところ、スフェロイドの形成初期には MIN6 細胞と NIH3T3 細胞はそれぞれの集合体を作り分散して存在するものの、時間が経過するにつれて NIH3T3 細胞が中央付近に集まってくるが見出された。この細胞移動は、medium の PDMS 製マイクロウェルで作製した直径 300 μ m 程度の比較的大きなスフェロイドで顕著であったことから、酸素分圧等のスフェロイドサイズに依存して変動する因子が混合型細胞スフェロイド内での細胞局在を決定している可能性が示された。

(3)混合型細胞スフェロイドにおけるインスリン産生

Ins-1 の mRNA 発現は、MIN6 細胞単独の場合、単層培養細胞と細胞スフェロイド間では有意な違いは認められなかった。これに対し、補助細胞を含む場合には、単なる混合培養と比較して、混合型細胞スフェロイドでは有意に高い発現を示した。また、Ins-2 に関しても同様の結果が得られた。また、インスリン放出は、MIN6/MAEC スフェロイドで最も高く、

グルコース濃度に依存した放出も認められた。以上より、補助細胞を利用することで MIN6 細胞からのインスリン放出性が改善可能であること、また、検討した細胞の中では血管内皮細胞株 MAEC 細胞が補助細胞として適していることが示された。

(4) 混合型細胞スフェロイドにおけるコラーゲン IV の発現

MIN6/MAEC スフェロイドにおける Col4a1、Col4a2 の発現量は、MIN6 単体細胞スフェロイドと比較して、それぞれ約 100 倍、約 1000 倍高かった。また、コラーゲン IV タンパク質は MIN6/MAEC スフェロイド中において強く検出された。以上より、混合細胞スフェロイドからのインスリン産生亢進は、補助細胞によるコラーゲン IV の存在が一部寄与することが示唆された。

(5) 混合型細胞スフェロイドの 1 型糖尿病モデルマウスにおける治療効果

糖尿病モデルマウスの腎皮膜下に MIN6/MAEC スフェロイドを移植した群は、懸濁 MIN6 細胞移植群、または MIN6 スフェロイド移植群と比較して、速やかに血糖値が低下した。以上より、補助細胞を混合した混合型細胞スフェロイドは、糖尿病治療に有効である可能性が示された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 3 件)

Kusamori K, Nishikawa M, Mizuno N, Nishikawa T, Masuzawa A, Shimizu K, Konishi S, Takahashi Y, Takakura Y. Transplantation of insulin-secreting multicellular spheroids for the treatment of type 1 diabetes in mice. *J Control Release*, 2014, 173, 119-124. DOI: 10.1016/j.jconrel.2013.10.024

Frisco-Cabanos HL, Watanabe M, Okumura N, Kusamori K, Takemoto N, Takaya J, Sato S, Yamazoe S, Takakura Y, Kinoshita S, Nishikawa M, Koizumi N, Uesugi M. Synthetic molecules that protect cells from anoikis and their use in cell transplantation. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2014, 53, 11208-11213. DOI: 10.1002/anie.201405829.

Takemoto N, Suehara T, Frisco HL, Sato S, Sezaki T, Kusamori K, Kawazoe Y, Park SM, Yamazoe S, Mizuhata Y, Inoue R, Miller GJ, Hansen SU, Jayson GC, Gardiner JM, Kanaya T, Tokitoh N, Ueda K, Takakura Y, Kioka N, Nishikawa M, Uesugi M. Small-molecule-induced clustering of heparan sulfate promotes cell adhesion. *J Am Chem Soc*, 2013, 135, 11032-11039.

DOI: 10.1021/ja4018682

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, 695-699.

DOI: 10.1016/j.jbiosc.2012.12.017

[学会発表](計 9 件)

田中悠太郎、荻野悠加、西川元也、西川智子、高橋有己、高倉喜信。静脈内投与された細胞の肺への集積の定量的評価と制御。第 31 回日本 DDS 学会学術集会、2015 年 7 月 2~3 日、京王プラザホテル(東京)(発表予定)。

水上優哉、西川元也、高橋有己、高倉喜信。混合スフェロイドにおける細胞局在化の原因究明。日本薬剤学会第 30 年会、2015 年 5 月 21~23 日、長崎ブリックホール(長崎)(発表予定)。

田中悠太郎、西川元也、荻野悠加、清水一憲、小西 聡、高橋有己、高倉喜信。マクロファージを用いた細胞スフェロイドの作製。日本薬学会第 135 年会、2015 年 3 月 25~28 日、神戸。

西川智子、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。肝細胞スフェロイドのサイズ制御による細胞機能の最適化。第 30 回日本 DDS 学会学術集会、2014 年 7 月 30~31 日、慶應義塾大学(東京)。

田中悠太郎、水野成美、水上優哉、西川元也、西川智子、草森浩輔、清水一憲、小西 聡、高橋有己、高倉喜信。混合細胞スフェロイドを用いた糖尿病治療効果の増強。日本薬剤学会第 29 年会、2014 年 5 月 20~22 日、大宮ソニックシティビル(大宮)。

西川智子、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。細胞スフェロイドサイズの制御に基づく肝細胞および癌細胞機能制御。第 29 回日本 DDS 学会学術集会、2013 年 7 月 4~5 日、京都テルサ(京都)。

水野成美、草森浩輔、西川元也、西川智子、清水一憲、小西 聡、高橋有己、高倉喜信。混合型細胞スフェロイドの構築によるインスリン産生細胞からのインスリン放出性の増強。第 29 回日本 DDS 学会学術集会、2013 年 7 月 4~5 日、京都テルサ(京都)。

西川智子、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 .
Micromolding 技術を利用した細胞スフェ
ロイドのサイズ制御と細胞機能に及ぼす
サイズの影響の解明 . 日本薬剤学会第 28
年会、2013 年 5 月 23 ~ 25 日、ウインクあ
いち (名古屋).

水野成美、草森浩輔、西川元也、西川智子、
清水一憲、小西 聡、高橋有己、高倉喜信 .
血管内皮細胞との混合型細胞スフェロイ
ドの開発によるインスリン産生細胞から
のインスリン放出性の増強 . 日本薬剤学会
第 28 年会、2013 年 5 月 23 ~ 25 日、ウイン
クあいち (名古屋).

6 . 研究組織

(1)研究代表者

西川 元也 (NISHIKAWA, Makiya)
京都大学・薬学研究科・准教授
研究者番号 : 4 0 2 7 3 4 3 7

(2)研究分担者

高倉 喜信 (TAKAKURA, Yoshinobu)
京都大学・薬学研究科・教授
研究者番号 : 3 0 1 7 1 4 3 2

高橋 有己 (TAKAHASHI, Yuki)
京都大学・薬学研究科・助教
研究者番号 : 0 0 5 4 7 8 7 0