

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：82612

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2017～2022

課題番号：16KK0192

研究課題名（和文）再生・移植医療用細胞・組織構築物の凍結保存・評価システムの開発（国際共同研究強化）

研究課題名（英文）Development of cryopreservation and evaluation system for cell and artificial tissue for regenerative and cell medicine(Fostering Joint International Research)

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・研究員

研究者番号：20425705

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 11,200,000円

渡航期間： 6ヶ月

研究成果の概要（和文）：細胞医療・細胞製品、医薬品等の品質・有効性・安全性の評価手法（毒性評価等）を提案することを目的に、三次元培養を用いたデバイス開発の現状と毒性評価系の探索を主に行い、その課題を明らかにする。その概要は、分化した神経様細胞の凍結保存と品質評価、マイクロ流体デバイスの開発と毒性評価系の現状、生殖医療における細胞、医薬品等の品質・有効性・安全性、スフェロイド培養デバイスの開発とナノ医薬品の毒性評価、MEMS技術による培養デバイスの開発と骨格筋組織の創製等である。各々の3D培養デバイスで、ナノ医薬品(磁性ナノ粒子)の毒性を評価した結果、再現性良く、in vivoに近い傾向のデータが得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、細胞医療・細胞製品、医薬品等の品質・有効性・安全性を評価するために、半導体製造プロセスや3Dプリンタを始めとする微細加工技術により培養デバイスが作製されている。創薬試験における動物実験代替となりうる生体模倣システムは、各々のデバイス（開発品、市販品）で特徴が異なるため、評価する必要がある。そこで、磁性ナノ粒子の毒性を評価した結果、再現性良いデータが得られ、学術的に意義があった。3D培養を始めとするOrgans on Chipsの開発の現状は欧米諸国に比べて大きく遅れをとっている。本研究では、実用化促進のために、3D培養デバイスを用いた医薬品等の安全性評価を行うことで、社会的に意義深い。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to evaluate the current status of the development of devices using three-dimensional (3D) culture and the quality, efficacy, and safety of cell medicine, cellular products, and pharmaceuticals. The outline of the project is as follows: 1) Cryopreservation and quality evaluation of differentiated neural-like cells, 2) Development of microfluidic devices and current status of toxicity evaluation systems, 3) Quality, efficacy, and safety of cells and drugs in reproductive medicine, 4) Development of spheroid culture devices and toxicity evaluation of nano-medicine, 5) Development of culture devices using MEMS technology and creation of skeletal muscle tissue. The toxicity of nanopharmaceuticals (magnetic nanoparticles) was evaluated using each of the 3D culture devices, and the results showed good reproducibility and in vivo-like trends.

研究分野：医用システム

キーワード：細胞・組織 凍結保存 品質 移植・再生医療 毒性評価 神経細胞 肝細胞 磁性微粒子

## 様式 F-19-2

### 1. 研究開始当初の背景

- (1) 細胞医療・細胞製品、医薬品等の品質・有効性・安全性の評価手法（毒性評価等）を提案することを目的に、申請者が見出した凍結細胞の毒性評価系をベースとして、その有効性・安全性を明らかにする。
- (2) 三次元培養を用いたデバイス開発の現状と毒性評価系の探索を主に行い、その課題を明らかにする（スフェロイド培養デバイス、マイクロ流体デバイス等）。

### 2. 研究の目的

#### (1) 分化した神経様細胞の凍結保存と品質評価

細胞医療、細胞製品を安定供給するために、凍結保存技術がある。多分化能を有する幹細胞やES細胞、iPS細胞などの場合、目的の細胞に分化した後に治療に用いるため、多くの時間とコストがかかる。あらかじめ、分化した細胞を大量に製造し、凍結保存することができれば、患者様に対して、すぐに治療に用いることができる。そこで、本研究では、神経様細胞に分化させた後に凍結保存して、その品質を評価することを目的とした。

#### (2) マイクロ流体デバイス（三次元培養）の開発と毒性評価系の現状

近年、複雑な微小環境を生体外で再現するデバイスとして、Organ on a Chip が注目されている。マサチューセッツ工科大学のKamm教授らは、異なる細胞を適切な配置で共培養し、適切な微小環境を設計して、これまでに多くの生体モデルを報告してきた。そこで、Kamm教授らの培養技術を学び、卵子の周囲を取り巻く「顆粒膜細胞」と「血管」による3Dモデルを作製し、その評価系を検証することを目的とした。

#### (3) 生殖医療における細胞、医薬品等の品質・有効性・安全性

近年、卵子の老化因子の影響や酸化ストレスの増加に伴い、卵子の質が低下するとともに、採卵数や受精率、妊娠率が低くなるようになってきた。現在、卵子の質は、その形態のみで評価しているのがほとんどであり、より高い受精率を達成すると共に、その後の良好な発育を促進するためには新たな評価法を確立する必要がある。そこで、受精卵をはじめとする細胞、医薬品等の品質・有効性・安全性について検討することを目的とした。

- ① 受精卵の品質評価系の検討
- ② 膜タンパク質CD9による細胞品質評価系の検討
- ③ 無機リン酸によるin vivo試験と安全性の検討
- ④ 不妊症の原因解明と医薬品候補物質の探索

#### (4) スフェロイド培養デバイス（三次元培養）の開発とナノ医薬品の毒性評価

ナノ医薬品を利用するために、その品質・有効性・安全性を評価することは必要不可欠である。本研究では、スフェロイド培養デバイスを用いて、細胞・組織構築物を創製して、ナノ医薬品を毒性評価することを目的とする。

#### (5) MEMS技術による培養デバイスの開発と骨格筋組織の創製

骨格筋組織工学は、筋肉の代替や筋肉疾患の治療など、その臨床応用が注目されている。骨格筋細胞の細胞密度を向上させる方法として、細胞内に磁性ナノ粒子を導入する方法が提案されている。本研究では、骨格筋組織の細胞密度に及ぼす磁性ナノ粒子内在化の影響を評価することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 分化した神経様細胞の凍結保存と品質評価

Neurobasal 培地(Gibco B-27 サプリメント併用)、レチノイン酸を用いて、SK-N-SH細胞(ヒト神経芽細胞腫由来)から神経細胞へ分化誘導した。分化した神経様細胞の凍結融解後の生細胞率、回収率および形態観察から膜障害等の品質を評価した。

#### (2) マイクロ流体デバイス（三次元培養）の開発と毒性評価系の現状

まず、Kamm教授らの報告より、細胞外マトリックス(ECM)としてコラーゲン(2.5mg/mL)を介した共培養モデルの作製およびその評価を行った。培養チップ内の構成は、中心チャンネルをコラーゲンゲルで満たし、両端のチャンネルを、ウシ頸動脈正常血管内皮細胞(HH cells)を播種し、各々HH細胞モノレイヤーを構築した。また、蛍光顕微鏡により、細胞培養チップ内が生細胞であること(Calcein-AM)、流路内にHH細胞の3D血管が構築されたことが確認できた。次に、細胞培養チップ内の異なるチャンネルにそれぞれCellTracker<sup>TM</sup>色素で標識したヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC; 緑および赤)を播種し、VEGF(血管内皮細胞増殖因子)の添加により、マトリックス内への血管新生の誘導が確認できた。

以上の結果を基に、「顆粒膜細胞」と「血管」による3Dモデルを作製し、その評価系を検証した。

- (3) 生殖医療における細胞、医薬品等の品質・有効性・安全性  
生殖医療における受精卵を始めとする細胞、医薬品等の品質・有効性・安全性を検討する。
- ① 受精卵の品質を評価した。
  - ② 膜タンパク質 CD9 を指標として、細胞膜での局在化および細胞外放出とその分泌物質等について検討した。
  - ③ モデルマウスを作製し、in vivoによる安全性を検証した。
  - ④ 不妊症の原因解明のために、男性不妊の原因である精子に注目し、不妊症の医薬品候補物質を探索した。マウスの精子頭部にクエン酸合成酵素が多く存在し、それを欠損させた雄マウスを作製して生殖能に関与するかどうか検討した。

(4) スフェロイド培養デバイス（三次元培養）の開発とナノ医薬品の毒性評価

ナノ医薬品である酸化鉄微粒子を調製し、その特徴を調べた。また、走査電子顕微鏡 (SEM) および透過電子顕微鏡 (TEM) 下で、酸化鉄微粒子の形態を観察した。

スフェロイド培養デバイス (Cell-able®) 上でラット初代肝細胞と頸動脈正常血管内皮細胞株である HH 細胞との共培養により作製した肝細胞・組織構築物に、性質の異なる酸化鉄微粒子 [リゾビスト (アニオン性微粒子; 臨床用 MRI 造影剤) およびカチオン性微粒子] を用いて、その増殖性、薬物代謝能、アルブミン分泌能を評価した

スフェロイド培養デバイス (TASCL) 上でヒト肝癌由来細胞株である HepG2 細胞より作製した肝細胞・組織構築物に、性質の異なる酸化鉄微粒子を用いて、細胞生死判定 (Calcein-AM)、細胞機能毒性判定 (グルタチオン、ミトコンドリア膜電位、ROS など) を評価した。使用したモノスフェロイドの大きさは、約 100 から 10,000 細胞の塊であった (サイズ: 約  $0.8 \times 10^6 \sim 5.7 \times 10^6 \mu m^3$ )。

(5) MEMS 技術による培養デバイスの開発と骨格筋組織の創製

マウス横紋筋由来筋芽細胞株である C2C12 細胞に、磁性ナノ粒子を用いて、細胞内への取り込みと、細胞の増殖・分化に及ぼす影響を評価した。また、ポリジメチルシロキサン (PDMS) 培養デバイス上で C2C12 細胞より作製した骨格筋組織シートの筋繊維方向を評価した。

<倫理面への配慮>

実験動物を用いる研究については、各大学・研究施設の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。ヒト細胞・組織を用いる研究については、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。また、それぞれの組織については倫理的な手続きおよび考え方が年次毎に異なると予想され、「ヒト幹細胞等を用いる臨床研究に関する指針」に従い、新の社会的な影響を十分に考慮する。さらに、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針 (平成 25 年 4 月 1 日改正) を遵守して本研究を実施する。

#### 4. 研究成果

(1) 分化した神経様細胞の凍結保存と品質評価

血清には、動物由来原料の抗原性変化や病原体混入の可能性があり、凍結細胞製品の安全性を高める上で必要不可欠である。また、ジメチルスルホキシド (DMSO) は、神経細胞に対して毒性障害が有することが報告されている。そこで、分化させた神経様細胞の凍結保存に有効な無血清かつ DMSO フリーの凍結液を見出すことに成功した。

(2) マイクロ流体デバイス（三次元培養）の開発と毒性評価系の現状

ヒト顆粒膜細胞癌細胞株 (KGN) のモデルの作製およびその評価を行った。作製した KGN モノレイヤーは、マトリックス中を浸潤し、培養 4 日後には異なるチャンネルまで到達した。続いて、KGN 細胞との 3D 血管モデル (HUVEC) を作製した。本評価系では、HUVEC と KGN 細胞とのパラクライン効果が期待できるため、異なるチャンネル間 (HUVEC と KGN) での細胞の分布や挙動と、細胞間の関係性について検証できた。

マイクロ流路デバイスを用いた毒性評価系の現状として、Kamm らが報告したデバイスを用いて、その薬効を評価した。ヒト神経芽細胞腫を播種・培養した後に、抗がん剤を投与し、その細胞挙動より、医薬品等の有効性・安全性を検証できた。

(3) 生殖医療における細胞、医薬品等の品質・有効性・安全性

- ① 初期発生過程において精子の融合が、 $Ca^{2+}$  振動と融合した精子のミトコンドリア運動 (走化性) を引き起こすことがわかった。
- ② マウスでは、CD9 は細胞膜の基底領域上に局在化し、胚着床時に先端領域へ移動した。さらに、細胞外の CD9 は、マウスおよび不妊症の女性の子宮分泌物中に検出された。一方、

多能性幹細胞の上清では検出可能なレベルを下回っていた。

- ③ 筋肉のミトコンドリア呼吸の低下を示した。雌では、乳酸の血中濃度は上昇したが、肝臓および脳組織における ATP 貯蔵は有意に減少した。
- ④ 受精卵が細胞分裂を始める (卵活性化) ためには、精子が卵に融合したことを知らせるシグナル (精子ファクター) が必要である。これまで、精子ファクターは、ホスホリパーゼ C ゼータと考えられてきたが、第 2 の候補として、クエン酸合成酵素を見出すことに成功した。

#### (4) スフェロイド培養デバイス (三次元培養) の開発とナノ医薬品の毒性評価

各々の酸化鉄微粒子を調製した。合成したカチオン性多糖磁性粒子複合体 (TMADM) の粒子の特徴を測定した (Diameter 44nm, Zeta Voltage +2mV, Cationic end-group substitution: 0.24)。各々のナノ粒子の形態は、比較的滑らかなエッジの効いた球状を示した。

3D 肝臓モデルとして、初代肝細胞・内皮細胞ヘテロスフェロイドを調整した。各種ナノ粒子で標識したヘテロスフェロイドにおいて、毒性、CYP3A、アルブミン分泌能の評価を行った。培養期間が進むにつれて、アニオン性およびカチオン性ナノ粒子で標識したヘテロスフェロイドは、非標識のヘテロスフェロイドに比べて肝機能が低下することがわかった。また、アニオン性ナノ粒子と比べて、カチオン性ナノ粒子の方が高い細胞毒性を示し、有意差が見られた。その理由として、カチオン性ナノ粒子は、細胞内に多く取り込まれるため、細胞毒性の影響は大きいと考えられる。

続いて、3D 肝臓モデルとして、サイズの異なる HepG2 モノスフェロイドを調整した。各々のモノスフェロイドの生死判定を行ったが (生細胞: Calcein-AM; 死細胞: Ethidium homodimer)、有意差は見られなかった。また、各種ナノ粒子で標識したモノスフェロイドにおいて、核染色 (DRAQ5)、グルタチオン (mBCI; Monochlorobimane)、活性酸素種 (ROS; CM-H2DCFDA) を指標に画像解析を行ったが、有意差は見られなかった。

#### (5) MEMS 技術による培養デバイスの開発と骨格筋組織の創製

C2C12 細胞に磁性ナノ粒子を添加すると、短時間に取り込まれ、非添加群と比べて、その増殖性に有意差は見られなかった。したがって、磁性ナノ粒子の添加による細胞毒性の影響は低いと考えられる。また、磁性ナノ粒子を標識した C2C12 細胞では、筋繊維の太さが減少する傾向が見られたが、細胞数や分化には影響が見られなかった。さらに、培養デバイス内に骨格筋組織シートを作製し、その繊維方向を全体的に揃えることに成功した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計21件（うち査読付論文 21件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 13件）

〔学会発表〕 計49件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 6件）

〔図書〕 計1件

1. 著者名 池内真志、宮本義孝、木村雄亮. マイクロデバイス技術がもたらす三次元培養の新展開. pp.77-82	4. 発行年 2019年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 294
3. 書名 患者由来がんモデルを用いたがん研究実践ガイド	

〔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
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	ロジャー カム  (ROGER Kamm)	マサチューセッツ工科大学・生物工学・教授	

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			
米国	Massachusetts Institute of Technology			