

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19H04454

研究課題名（和文）高速な3次元組織化を実現する細胞パッチ法を利用した革新的ヒト腫瘍モデルの創製

研究課題名（英文）Development of innovative human tumor models using cell patch method for high-speed three-dimensional organization

研究代表者

中山 正道（Nakayama, Masamichi）

東京女子医科大学・医学部・講師

研究者番号：00338980

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,200,000円

研究成果の概要（和文）：過重力付加と作用時間を最適化することで、ヒト癌由来細胞から安定なシート状構造を有する高密度充填組織化したがん前駆組織体（がん細胞パッチ）を作製した。パッチ作製時に使用するシリコン製チャンバーの形状・サイズおよび添加細胞数を変化させることで、サイズ形体および組織厚が異なる多様な細胞パッチを得ることが可能であった。またがん細胞パッチを免疫不全モデル動物に移植することで、細胞注入法と比較して、効率的に腫瘍形成できることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒト癌由来細胞から作製したシート状高密度細胞組織であるがん細胞パッチは、形状やサイズの調節や3次元組織化も容易であり、高い汎用性と生産性を有することが明らかとなった。また、生体内移植により高い腫瘍形成能を有しており、新しい生体外がん前駆体としての特徴が示された。今後、がん細胞パッチの構造的・機能的特徴を明らかにしながら、より生体がんに近いがんモデルを構築することで、創薬研究や個別化医療への応用に向けた高い生産性と汎用性、低コスト化を実現する新しいがん組織工学が期待された。

研究成果の概要（英文）：Well-defined cancer progenitor tissues (cancer cell patches) with a stable sheet-like structure and high-density packing organization of human cancer-derived cells were prepared by optimizing the hypergravity addition and the duration of action. While clarifying the structural and functional characteristics of cancer cell patches, we will construct cancer models that more closely resemble living cancers to pursue new cancer tissue engineering that is highly productive, versatile, and low-cost for application in drug discovery research and personalized medicine. Various cell patches with different sizes, shapes, and thicknesses were able to be effectively obtained by changing the silicone inserts used and the number of applied cells. In addition, the transplantation of the cancer cell patches into immunodeficient animal models resulted in more efficient tumorigenesis compared to the general cell injection method.

研究分野：バイオマテリアル、高分子化学、組織工学

キーワード：細胞パッチ がん細胞 過重力 がん組織工学 腫瘍モデル 担癌モデル動物

### 1. 研究開始当初の背景

がん創薬研究では、がん細胞培養系や担がん動物を用いた薬物感受性試験をおこなうがその精度は高くなく、ヒト疾患に対する効果の予測と信頼性には問題がある。*in vitro* 評価系では、同質がん細胞の単層培養系を使用するが、生体内組織と異なるため、限定的なデータしか得られない。一方、前臨床試験で利用される担がん動物 (*in vivo* 腫瘍モデル) の作製では、簡便であるのに対して細胞生着率に問題がある、がん細胞懸濁液の皮下注入法を主に利用する。薬物スクリーニングの精度と重要性を高めるためには、実際のがん組織の形態的・機能的特徴を有する組織モデルを効率的に作製する新しい技術が必要である。我々はこれまでに温度応答性培養皿を用いて、がん細胞の単層組織であるがん細胞シートを作製し、生体組織への貼付による *in vivo* 腫瘍形成能の改善や、生体に近い薬物応答性を示す *in vitro* モデルの構築など、その有用性を明らかにした。その反面、強接着性を示す細胞の利用において、シート化が困難なケースがあるほか、3次元(3D)組織化に数日間にわたる操作が必要など、創薬研究や個別化医療への応用を考えた場合、高い生産性と汎用性、低コスト化を実現する技術開発が望まれた。

### 2. 研究の目的

既往研究において、がん細胞シートの *in vivo* 移植による腫瘍形成能の改善や *in vitro* がん組織の生体模倣性の点でその有用性を明確にした反面、創薬研究や個別化医療への応用に向けて依然解決すべき課題があった。まず、強接着性細胞の場合、温度のみで細胞シートを剥離回収できないケースが多い。また、3D組織構築では、「接着培養 シート化 積層化」の数日間のプロセスが必要となる。この打開策として、最近我々は、第2の細胞組織化法として、過重力付加により作製するシート状高密度充填細胞組織「細胞パッチ」に関連する技術を開発した[1]。細胞パッチは短時間で作製でき、心筋細胞パッチでは組織的機能を数時間で発現することがわかっている。移植技術などを含む細胞シート関連技術と高速組織化が可能な細胞パッチ法を融合させることで、高い汎用性と生産性をもつヒト腫瘍モデルの構築が期待された。

本研究では、過重力付加によりヒト臓器がん由来の細胞株を用いて、がん前駆組織体となる「がん細胞パッチ」を作製し、以下の項目を中心とする基礎検討により、新しいヒトがん組織工学の基盤技術の提案・実現を目的とした。

- (1) 各種ヒト臓器がん由来細胞株を用いて、安定な細胞パッチの作製について、過重力付加と作用時間を含めた最適化と、培養チャンバーの形状・底面積や細胞数の調節による細胞パッチのサイズ形体と組織厚の制御に関する検討。
- (2) 生体組織への移植等に必要ながん細胞パッチのマニピュレーション法に関する検討。
- (3) がん細胞パッチ移植による生体組織への細胞生着率、がん組織増殖性、および形成する腫瘍の組織学的評価。

### 3. 研究の方法

#### (1) 過重力付加によるがん細胞パッチの作製条件

各種ヒト臓器がん由来細胞株は、JCRB 細胞バンクより入手した凍結細胞を継代培養したものを使用した。基本操作としては、温調機能付きのスイング型遠心機による過重力付加を利用して細胞パッチを作製した(図1)。過重力は、35 で5分間、270Gを付加した。またサイズ形体が異なる細胞パッチを作製するために、サイズと形状が異なる孔を形成できるポリアセタール製モールドを用いて、シリコン樹脂製(KE-1308/CAT-1300L-3、信越化学工業)のさまざまな細胞培養チャンバーを作製した(図2)。この培養チャンバーを35-mm細胞培養皿上に設置し、ウェル内に細胞懸濁液を添加後、過重力付加をおこなった。その後、37、5% CO<sub>2</sub>環境下で任意時間培養後、チャンバーの除去と培地交換をおこなった。培養1日後にピペット操作により細胞パッチを剥離回収した。

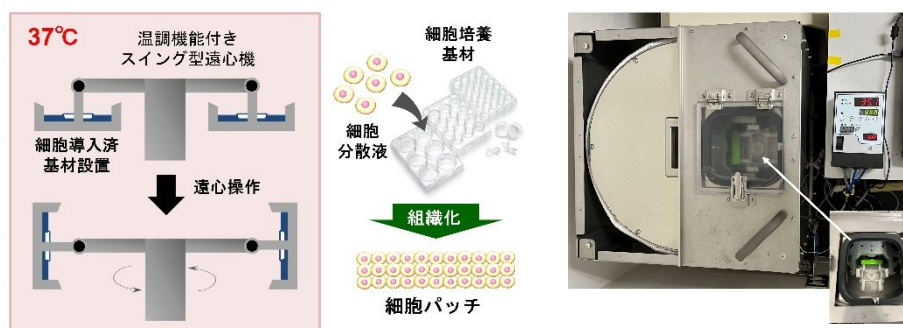


図1 温調機能付きスイング型遠心機を利用した細胞パッチ作製法

(2) 各種がん細胞パッチの作製と形態学的評価  
ヒト結腸腺癌由来細胞株 (HCT-116 clone#2-Luc/JCRB1408、以下 HCT-116 とする)

McCoy's 5A (Modified) Medium (10% FBS、100 units/mL penicillin-100  $\mu$ g/mL streptomycin 含有) を培養液とした。細胞培養表面処理済みの 35-mm ポリスチレン製培養皿にシリコン製チャンバーを設置し、任意細胞数を含む懸濁液をウェル内に添加し、遠心処理をおこなった。次に 37  $^{\circ}$ C で 12 時間程度培養後、チャンバー除去と培地交換をおこなった。

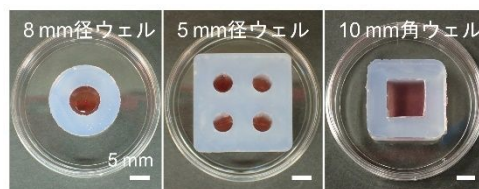


図2 パッチ作製に使用するチャンバー

ヒト肝がん由来細胞株 (HuH-7/JCRB0403)

Dulbecco's Modified Eagle Medium (10% FBS、100 units/mL penicillin-100  $\mu$ g/mL streptomycin 含有) を培養液とした。表面未処理の 35-mm ポリスチレン製培養皿にシリコン製チャンバーを設置し、任意細胞数を含む懸濁液をウェル内に添加し、遠心処理をおこなった。次に 37  $^{\circ}$ C で 4 時間培養後、チャンバー除去と培地交換をおこなった。

ヒト子宮頸部類上皮がん細胞株 (HeLa/JCRB9004)

Dulbecco's Modified Eagle Medium (10% FBS、100 units/mL penicillin-100  $\mu$ g/mL streptomycin 含有) を培養液とした。両親媒性ブロック共重合体である poly(butyl methacrylate)-*b*-poly(4-acryloylmorpholine) 溶液 (400  $\mu$ g/mL) を細胞培養表面処理済みポリスチレン製培養皿上にスピンコート (3000 rpm) した低細胞吸着性基材 [2] にシリコン製チャンバーを設置し、任意細胞数を含む懸濁液をウェル内に添加し、遠心処理をおこなった。次に 37  $^{\circ}$ C で 4 時間培養後、チャンバー除去と培地交換をおこなった。

いずれの細胞パッチ作製においても、培地交換後に任意期間 37  $^{\circ}$ C で培養し、ピペット操作により細胞パッチを剥離回収した。細胞パッチは、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色した薄切切片による組織学的観察と添加細胞密度 (cells/cm<sup>2</sup>) による組織厚の違いについて光干渉断層撮影 (OCT) により評価した。

(3) *in vivo* 腫瘍形成能の評価

宿主組織に対するがん細胞シートの生着率と移植後のがん増殖能の基礎的評価をおこなうために、HCT-116 細胞から作製したがん細胞パッチ (8-mm 径、細胞数  $8 \times 10^5$  cells で作製) を免疫不全ラット (F344/NJcl-rnu/rnu、8 週オス) に皮下移植した。まず溶解した 8% ゼラチン溶液を 17-mm 径 CellShifter<sup>TM</sup> 支持膜に付与し、培養皿上に付着した細胞パッチ上に被覆させ、20 分で 10 分間静置した。支持膜で剥離した細胞パッチを切開したラット背部皮下組織に貼付し、37  $^{\circ}$ C で 5 分間程度温めた。その後、支持膜のみを除去し、皮膚を縫合した。また、細胞パッチ法による細胞移植効率の有効性を検証するために、トリプシン/EDTA 処理した細胞パッチから調製したがん細胞懸濁液を同様の箇所に皮下注入する手法と比較した。がん増殖能に関しては、ノギスによるサイズ計測に加え、形成した腫瘍について薄切切片による組織学的解析をおこなった。

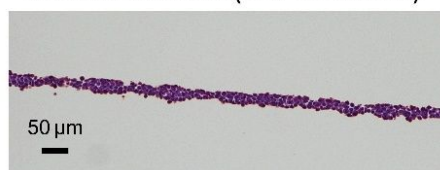
4. 研究成果

(1) 過重力付加によるがん細胞パッチの作製と形態学的評価

各種ヒト臓器がん由来細胞株を過重力付加で細胞パッチ化するためのプロトコルの最適化を検討した。既報の細胞パッチ作製では、80G で 30 分間の過重力付加を適用していた [1] が、270G で 5 分間処理後、細胞種に応じて任意時間 37  $^{\circ}$ C で培養をおこなうことでピペット操作により崩壊しない安定なシート状組織を作製できることがわかった。しかしながら、筋芽細胞等の細胞-細胞間結合が安定した細胞種を用いて作製した細胞パッチと比較して、細胞-細胞間結合が脆弱ながん細胞の場合、最低 1 日程度の 37  $^{\circ}$ C における培養が必要であった。特に HuH-7 細胞や HeLa 細胞では過重力付加後に 3 時間程度でチャンバー除去と培地交換が可能であったのに対して、HCT-116 細胞では組織が崩壊しないように 12 時間程度の培養が必要であった。

細胞パッチを作製する際に使用する培養基材の表面特性は、パッチ組織をピペット操作で剥離回収する上できわめて重要な要素であった。これは過重力付加後の培養時に細胞パッチ組織が基材に接着する強度が大きく異なるためであると推測された。本研究で使用した細胞では、HeLa 細胞が最も強い表面接着性を示し、HCT-116 細胞が最も弱い性質を示した。そこで、マイルドなピペット操作でパッチ組織を剥離させるために細胞種に応じたベース基材の検討をおこなった。弱接着性を示す HCT-116 細胞では細胞接着処理済みポリスチレン表面、

HCT-116 clone#2-Luc ( $1.6 \times 10^6$  cells/cm<sup>2</sup>)



HuH-7 ( $1.0 \times 10^6$  cells/cm<sup>2</sup>)



HeLa ( $1.6 \times 10^6$  cells/cm<sup>2</sup>)



図3 各種ヒトがん細胞株から作製した細胞パッチの薄切切片 (HE 染色像)

中接着性を示す HuH-7 細胞では未処理ポリスチレン表面が最適であった。一方、強接着性を示す HeLa 細胞では、両親媒性ブロック共重合体をスピコートした低接着性ポリスチレン表面を作製することで安定な細胞パッチを剥離回収することに成功した。各種がん細胞株から作製したパッチ組織の HE 染色像より高密度に細胞が充填されたシート状構造を有していることが明らかになった(図 3)。また各細胞から構成されるパッチ組織の厚さは各細胞の大きさに依存するものと考えられた。

過重力付加の有無による細胞パッチ組織の違いを OCT 像で比較した結果、過重力非付加で作製した HuH-7 パッチは、過重力付加で作製したパッチ組織と比較して細胞充填度が比較的低く、パッチ組織表面の円滑性が乏しく、部分的な欠陥部を生じていることが確認された(図 4)。この結果より、安定なパッチ組織の構築には過重力付加が必要であると考察した。

ウェルの形状と底面積が異なるシリコン製チャンバーを用いることで、生体組織への移植等のアプリケーションに応じて、細胞パッチのサイズ形体を設計できることが明らかとなった(図 5)。本研究では、特に 4 穴のシリコン樹脂製チャンバーを利用することで、パッチ組織を均一に複数個同時に作製できることを明らかとなり、将来的ながん細胞パッチの高い生産性が期待された。

一方、細胞パッチ作製時の添加細胞密度を調節することで、細胞パッチの組織厚を任意に制御することが可能であった(図 6)。従来の温度応答培養皿を利用した細胞シート法では、3D がん組織モデルの構築に数日にわたるプロセスが必要であった。これに対して、細胞パッチ法では短期間で 3D 組織を作製できることが示された。

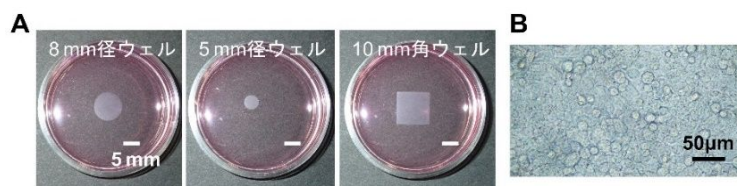


図 5 (A)形状とサイズが異なる細胞パッチと(B)パッチ表面の位相差顕微鏡像 (HCT-116,  $2 \times 10^6$  cells/cm<sup>2</sup> 適用)

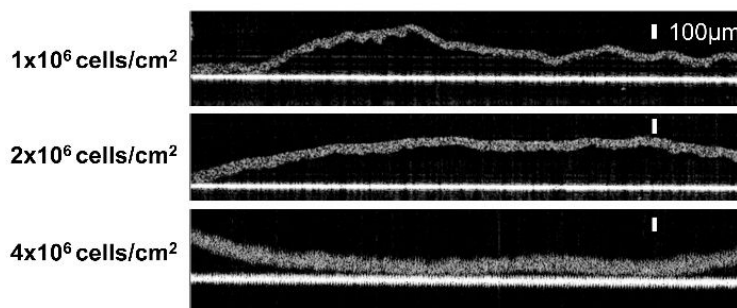


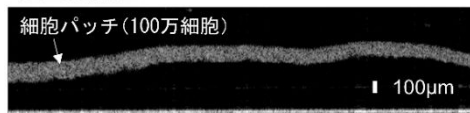
図 6 細胞数とがん細胞パッチの組織厚の関係 (HCT-116)

## (2) *in vivo* 腫瘍形成能の評価

HCT-116 細胞から作製した 8-mm 径細胞パッチを用いて、免疫不全ラットへの皮下移植実験をおこなった。作製した細胞パッチを酵素処理後に細胞数計測をおこなった結果、24 時間後ではパッチの構成細胞数は  $1.2 \times 10^6$  cells であり、添加細胞数より増殖している結果となった。本研究では、生体組織への効率的な細胞パッチ移植を実現するために、溶解したゼラチン溶液で湿らせた支持膜を利用した。この手法では、培養皿表面に付着した細胞パッチをゼラチン付与支持膜で被覆し、低温で細胞パッチを支持膜と一体化させる。これによりピンセット操作により伸展状態の細胞パッチを基材表面より移送させることが可能となった。細胞パッチ/支持膜をラット皮下組織上に貼付し、37 °C で 5 分程度温めることで支持膜のみを容易に除去することに成功した。

移植 3 週間後にパッチ移植部において、顕著な腫瘍形成が観察された(長軸/短軸/高さ: 17mm/13mm/9mm)。これに対して、皮下組織に同細胞数を注入移植した場合では、きわめて小さい腫瘍(細胞パッチ移植法の 1/200 以下の腫瘍体積)あるいは非形成が確認された(図 7)。移植法による腫瘍形成能の相違の原因として、移植がん細胞の組織生着率の違いが考えられた。トリプシン EDTA 処理によって回収した細胞群では、酵素処理により細胞膜の接着タンパク質が分解されてしまい、移植した細胞が生着せずにほとんど排除されると推察された。一方、細胞パッチは安定なシート構造のために移植後に皮下に生着しやすいため、移植効率が極めて高いと考えられた。宿主組織との連結の結果、細胞増殖に必要な生体成分・酸素が供給され、腫瘍の増大が誘起されたものと考察された。本技術を応用することで、将来的には、ヒト同所がん移植モデルの構築への応用が期待された。

過重力付加



過重力非付加

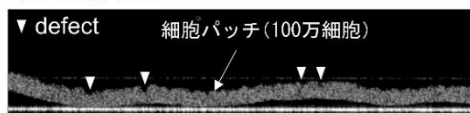


図 4 過重力付加の有無による HuH-7 パッチ(8-mm 径)の OCT 像

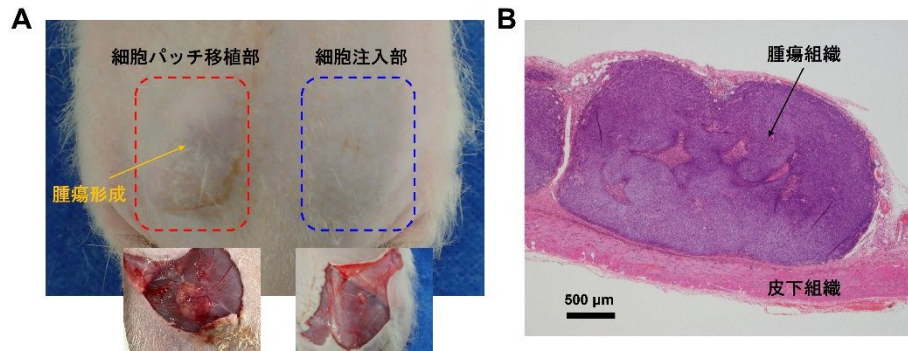


図7 (A)移植法による腫瘍形成の違い(左)細胞パッチ皮下移植と(右)細胞皮下注入移植  
(B)細胞パッチ移植で形成した腫瘍薄切切片(HE染色)

<引用文献>

- [1] Y. Haraguchi, K. Matsuura, Y. Kagawa, A. Hasegawa, H. Kubo, T. Shimizu, Rapid creation system of morphologically and functionally communicative three-dimensional cell-dense tissue by centrifugation, *Biotechnol. Prog.*, 34(6), 2018, 1447-1453
- [2] M. Nakayama, Y. Toyoshima, A. Kikuchi, T. Okano, Micropatterned Smart culture surfaces via multi-step physical coating of functional block copolymers for harvesting cell sheets with controlled sizes and shapes, *Macromol. Biosci.* 2021, 21, 2000330

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nakayama Masamichi, Toyoshima Yuki, Chinen Hiroshi, Kikuchi Akihiko, Yamato Masayuki, Okano Teruo	4. 巻 8
2. 論文標題 Water stable nanocoatings of poly(N-isopropylacrylamide)-based block copolymers on culture insert membranes for temperature-controlled cell adhesion	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Materials Chemistry B	6. 最初と最後の頁 7812 ~ 7821
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D0TB01113D	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakayama Masamichi, Toyoshima Yuki, Kikuchi Akihiko, Okano Teruo	4. 巻 21
2. 論文標題 Micropatterned Smart Culture Surfaces via Multi Step Physical Coating of Functional Block Copolymers for Harvesting Cell Sheets with Controlled Sizes and Shapes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Macromolecular Bioscience	6. 最初と最後の頁 2000330 ~ 2000330
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/mabi.202000330	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 中山正道	4. 巻 36
2. 論文標題 リビングラジカル重合-可逆的付加開裂連鎖移動重合	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Drug Delivery System	6. 最初と最後の頁 69 ~ 71
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 5件）

1. 発表者名 中山正道、岡野光夫
2. 発表標題 ポリスチレン表面改質が温度応答性培養基材の細胞接着性に及ぼす影響とその応用
3. 学会等名 第71回高分子討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中山正道、岡野光夫
2. 発表標題 ポリスチレンベース基材の表面改質が温度応答性ナノ薄膜表面への細胞接着に及ぼす影響
3. 学会等名 第44回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Nakayama Masamichi, Tonegawa Junichi, Kikuchi Akihiko, Okano Teruo
2. 発表標題 Micropatterned smart surfaces via physical polymer coatings for fabricating cell sheets with on-demand morphological structures
3. 学会等名 The 43rd Annual Meeting of the Japanese Society for Biomaterials and the 8th Asian Biomaterials Congress (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Nakayama Masamichi, Tonegawa Junichi, Kikuchi Akihiko, Okano Teruo
2. 発表標題 Micropatterned thermoresponsive surfaces via physical block copolymer coatings for fabricating cell sheets with designed morphological structures
3. 学会等名 2022 Hawaii-Joint Symposium-SFB+JSB (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Nakayama Masamichi, Akimoto Jun, Okano Teruo
2. 発表標題 Transplantation of sheet-like cancer cell tissues for orthotopic tumor-bearing animal models
3. 学会等名 47th Annual Meeting of the Controlled Release Society (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Nakayama Masamichi
2. 発表標題 Stimuli-responsive polymer nanocoatings on culture substrates for smart cell adhesion control
3. 学会等名 The 30th Frontier Scientists Workshop (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中山正道、利根川純一、菊池明彦、大和雅之、岡野光夫
2. 発表標題 ポリマースタンプ法で作製したパターン化スマート表面を用いた細胞シートの構造制御
3. 学会等名 第15回ナノ・バイオメディカル学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 北嶋健太郎、中山正道、菊池明彦、岡野光夫
2. 発表標題 親水性基を導入した温度応答性ブロック共重合体コート表面における細胞接着/脱着挙動
3. 学会等名 第69回高分子討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Nakayama Masamichi, Tonegawa Junichi, Kikuchi Akihiko, Okano Teruo
2. 発表標題 Controlled structure of cell sheets using micropatterned thermoresponsive surfaces prepared by polymer stamping method
3. 学会等名 30th Annual Conference of the European Society for Biomaterials (国際学会)
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	増田 信奈子  (Masuda Shinako)  (30342851)	東京女子医科大学・医学部・助教   (32653)	
研究分担者	関根 秀一  (Sekine Hidekazu)  (60541737)	東京女子医科大学・医学部・准教授   (32653)	
研究分担者	原口 裕次  (Haraguchi Yuji)  (80272251)	東京女子医科大学・医学部・特任准教授   (32653)	
研究分担者	秋元 淳  (Akimoto Jun)  (80649682)	国立研究開発法人理化学研究所・創発物性科学研究センター・研究員   (82401)	

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
---------	---------