

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：17102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20517

研究課題名（和文）抗がん剤スクリーニングに向けた成長因子の徐放技術を活用した3次元組織体の構築

研究課題名（英文）Design of three-dimensional tissue models for anti-cancer drug screening utilizing growth factor release system

研究代表者

新居 輝樹（Nii, Teruki）

九州大学・工学研究院・助教

研究者番号：90908419

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,100,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、3次元組織体内部まで酸素や栄養分を十分に供給できるゼラチンハイドロゲル粒子を作製し、生体内の組織環境を模倣することである。特に、ゼラチン粒子の徐放化システムを導入することで、生体内での成長因子の分泌の模倣まで試みた。はじめに、粒子に親水性のタンパク質を含浸させることで粒子の分解に依存して薬物が放出されることが分かった。また、そのタンパク質を含む粒子に対してさらに疎水性薬物を含浸させたところ、各々の薬物の放出スピードが遅くなることを明らかにした。この粒子を3次元組織体内部に組み込んだところ、腫瘍関連遺伝子の発現が増大していることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ディッシュやプレートといった単層での培養条件と動物の体内環境は大きく異なるため、新薬の効能に大きな差が生じてしまい、薬効や副作用を適切に評価することが難しかった。本研究で作製された3次元組織体は生体環境に近い性質を有しているため、新薬開発に大きく貢献できる。これは創薬の期間短縮、コストの削減、ならびに実験動物の最小化が期待できる。さらには動物を犠牲にしない動物代替モデルとしての可能性も秘めていることから、本研究が示す社会的意義は大きい。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to mimic the in vivo tissue environment by preparing gelatin hydrogel particles that can provide sufficient oxygen and nutrients to the inside of 3D tissue bodies. In particular, not only the culture dimension but also the secretion of growth factors in vivo was attempted to replicate by introducing a sustained release system of gelatin particles. First, it was found that by impregnating the particles with a hydrophilic protein, the drug was released depending on the degradation of the particles. In addition, when the protein-containing particles were further impregnated with hydrophobic drugs, the release speed of each drug was slowed down. Finally, when the particles were inserted into 3D tissues, it was found that the expression of tumor-related genes in the 3D tissues increased.

研究分野：組織工学 創薬 DDS

キーワード：薬物徐放 がん 3次元培養 組織工学 生体材料

## 1. 研究開始当初の背景

がんは日本の死因一位であり、新たな抗がん剤の開発が求められている。現在の抗がん剤開発において、細胞を用いたスクリーニング、ならびに動物実験による非臨床試験は最初の大きなハードルとなっている。特に、スクリーニングと非臨床試験で候補化合物の研究結果が大きく異なることは、抗がん剤の開発期間やコストの大幅なロスに繋がる。実験結果にギャップが生じる一番の要因としては、がん細胞の培養環境が体内のがん環境と大きく異なっていることにある。そのため最近では、生体のがん環境を模倣すべく、3次元組織体の構築を目指す研究が国内外で活発に行われている。がんとは異なるが、この3次元組織体は、培養肉や細胞移植治療などによって一般的に広く認知されるようになってきた。特に、化粧品開発に向けた動物実験の代替法としても注目を集めるようになってきており、この技術のさらなる発展は必要不可欠なものとなってきた。この3次元組織体の進展により大きく課題となるのが、構築した3次元組織体を長期に培養する技術である。3次元組織体内部まで酸素や栄養分が十分に供給されないことでアポトーシスが生じてしまい、その細胞活性は著しく低下してしまう。さらにはその細胞死のみならず、実際のがん環境で活発に行われている成長因子の分泌を模倣することも難しく、がん環境を模倣した状態で3次元組織体を長期に培養する技術の開発が必要と考えらる。新規技術のポイントとは、これらの問題点を同時に解決できるマテリアルの作製と最適化である。

## 2. 研究の目的

上記の研究開発当初の背景に基づき、本研究では、3次元組織体の長期培養に適するバイオマテリアルとしてゼラチンハイドロゲル粒子を作製し、その最適化と機能評価を目的とした。ゼラチン粒子は水分を豊富に含有しているため、酸素や栄養分の通り道として機能する。また、成長因子を徐放するマテリアルとしても有用であることから、生体内で生じている成長因子の分泌を再現することも可能となる。具体的には、がん生物学、薬物送達学、およびナノテクノロジーを活用し、3次元組織体の内部から成長因子を送り込むことが可能なゼラチン粒子を創製する。この粒子を用いて複雑ながん環境を生体外で構築するシステムの創製にチャレンジする。このチャレンジには、成長因子や分子機能を制御する疎水性薬物の徐放化とその最適化を目指す。次に、その粒子を含む3次元組織体を組織工学を用いて構築し、その組織体がもつ遺伝子発現を評価する。

薬物徐放化を組み込んだ3次元組織体の構築が成功すれば、これまで困難とされてきた3次元組織体の長期培養と活性維持のための成長因子分泌の再現を同時に達成することが可能となる。また、このように本技術は、期待が集まる創薬技術のための3次元組織化に貢献し、大きな社会的意義をもつことは疑いない。

## 3. 研究の方法

本研究の目的を達成するため、令和2年から令和3年にわたり、(1)ゼラチン粒子の作製とその評価、(2)組織工学を用いた3次元組織体の作製と評価を設定し、それらについて研究を行った。

### (1) ゼラチン粒子の作製と評価

ゼラチン(等電点9.0、重量平均分子量100,000)の水溶液へ架橋剤であるグルタルアルデヒドを添加し、ゲル化させた。一定時間後、グリシン処理、洗浄、凍結乾燥を行うことにより、化学架橋されたゼラチンハイドロゲル粒子を得た。この粒子に、トランスフォーミング増殖因子(TGF- $\beta$ )を含むリン酸緩衝整理食塩水(PBS)を滴下、37℃で一晩静置することで、TGF- $\beta$ を粒子に含浸させた。この作製された2つの粒子から放出される薬物の挙動を評価するために、2つの粒子をそれぞれPBS中で37℃条件下で静置した。さらに実験開始6時間後にPBSからコラゲナーゼに置換して実験を継続した。各時間毎に上清を回収し、上清中の成長因子濃度を測定した。この時、TGF- $\beta$ に関してはELISA法によって測定した。さらに、オートファジーを誘導するラパマイシンを含むメタノール溶液を粒子に滴下することで、TGF- $\beta$ とラパマイシンを同時に含む粒子を作製した。この粒子に関しても先ほどと同様に薬物放出試験を行った。上清中のラパマイシン濃度は高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いて測定した。

### (2) 組織工学を用いた3次元組織体の作製と評価

TGF- $\beta$  はがんの悪性化を促進する成長因子、ラパマイシンはオートファジーを活性化させる薬物として用いた。TGF- $\beta$  とラパマイシンの両者を含有する粒子とヒト由来子宮頸がん株 HeLa 細胞を低接着性 U 底 well にて培養することで、粒子を含む3次元組織体を作製した。この3次元組織体の機能評価として悪性度を示す EMT 関連遺伝子(N-カドヘリンならびにビメンチン)の発現について real time PCR によって測定した。

## 4. 研究成果

### (1) ゼラチン粒子の作製と評価

薬物を含まない空のゼラチンの粒子を、ゼータサイザーを用いて測定したところ、約 200 nm であった。この粒子に TGF- $\beta$  を含浸させると、その粒子サイズは 225 nm へと変化が見られた。これは含浸させた TGF- $\beta$  によるものであると考えられる。また、この粒子を溶解させて、粒子に含浸される TGF- $\beta$  濃度を測定したところ粒子への含有効率は 99.0% であり、粒子の高い含浸能を示した。この粒子からの TGF- $\beta$  の放出挙動は、PBS 中では 25% 程度でプラトーに達した一方で、コラゲナーゼ溶液に置換することでその放出は一気に加速した(図 1)。これは成長因子の放出が粒子の分解に依存していることを示している。粒子を分解する酵素(VEGF や MMP など)は細胞が 3 次元組織体を形成することで一気に産生されることが知られている。このことから、成長因子の粒子からの放出は 3 次元組織体を形成したのちに生じることを示唆しており、成長因子の効率的な放出が可能であると考えられる。また、疎水性薬物ラパマイシンを溶解したメタノール溶液を先ほどの粒子に含有したのちに同様の放出試験を行ったところ、粒子に含浸させるラパマイシンの濃度が高くなるほど、TGF- $\beta$  の放出が遅延してより長期で徐放できることが明らかになった。これまでゼラチン粒子からの成長因子の放出挙動を変化させる手法は、架橋剤であるグルタルアルデヒドの濃度を変化させることが一般的であった。しかしながら、グルタルアルデヒドは細胞毒性を示すため、高濃度の添加は好まなかった。今回の実験結果では、グルタルアルデヒドの濃度を変化させることなく、粒子に含浸させる疎水性薬物の濃度を変化させることで成長因子の放出挙動を制御できるという新たな知見を副産物的に得ることができた。

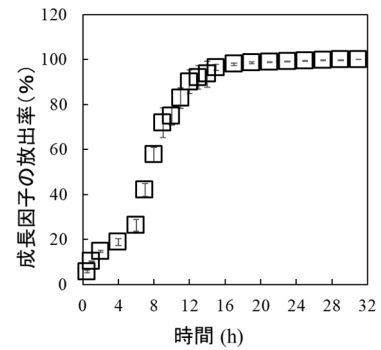


図 1 成長因子の放出挙動

(実験開始 6 時間後、PBS からコラゲナーゼ溶液に置換)

### (2) 組織工学を用いた 3 次元組織体の作製と評価

はじめに、粒子を含まない 3 次元組織体を作製したところ、培養後 3 日には細胞死していたことから、粒子の含有は 3 次元組織体内部まで十分に酸素や栄養分を供給するために必要な材料であった。

ラパマイシンによって TGF- $\beta$  の粒子からの放出が変化したことで、3 次元組織体全体の EMT 関連遺伝子にも変化が見られた。TGF- $\beta$  の放出が 12 時間で完了した粒子では、作製された 3 次元組織体の N-カドヘリンやビメンチンの発現は、培養 2 日後と早期に見られた。一方でその発現期間は 5 日程度に留まった。ラパマイシンによって TGF- $\beta$  の放出の放出が 72 時間まで延長された粒子では、その発現は培養 5 日後と遅くなったが、その発現期間は 2 週間程度まで維持されることが分かった。これは成長因子の徐放によってがん細胞の機能発現を維持できることを示している。しかしながら、TGF- $\beta$  の放出をさらに遅延させるべくラパマイシンの含浸濃度をさらに高めると、EMT 関連遺伝子の発現は見られなくなった。これは、高濃度のラパマイシンは抗腫瘍効果に関与しているからであると考えられる。この結果によってラパマイシンの最適な濃度を決定することができたと考えている。これらのことから、本来オートファジーを誘導すべく粒子に含浸させたラパマイシンは、元来の目的以上に、成長因子の徐放プロファイルを自在に変化させる役割を果たしたことを明らかとした。

今後は、がん細胞のみならずその周辺に存在する間質細胞を 3 次元組織体に導入することでがん環境をより再現できるモデルを作製していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 1件）

1. 著者名 Nii Teruki	4. 巻 26
2. 論文標題 Strategies Using Gelatin Microparticles for Regenerative Therapy and Drug Screening Applications	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 6795 ~ 6795
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/molecules26226795	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Nii Teruki	4. 巻 37
2. 論文標題 Three-dimensional culture system utilizing DDS technology	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Drug Delivery System	6. 最初と最後の頁 270 ~ 271
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2745/dds.37.270	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Teruki Nii
2. 発表標題 Drug screening model utilizing 3D cell culture and drug release system
3. 学会等名 2nd International Conference on Functional Materials and Chemical Engineering.（招待講演）
4. 発表年 2022年 ~ 2023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
---------------------------	-----------------------	----

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