

京都大学	博士（薬学）	氏名	水上 優哉
論文題目	高機能細胞スフェロイド開発を目的としたスフェロイド微小環境制御に関する研究		
<p>細胞凝集体である細胞スフェロイドは、その内部で生体組織と同様に細胞—細胞間相互作用および細胞—細胞外基質間相互作用が生じ、細胞本来の機能が発揮されることから、細胞移植治療や組織モデルとしての応用が期待されている。その一方で、既存の細胞スフェロイドでは、複数種類の細胞で構成される混合細胞スフェロイドにおける細胞の位置が制御されていないこと、内部への酸素や栄養の送達が不十分なことなどの問題がある。そこで申請者は、高機能細胞スフェロイドの開発を目的に、細胞スフェロイド内外の微小環境に着目し、これを制御することで上記課題の解決を試みた。</p> <p>第1章 混合細胞スフェロイド中の細胞局在決定因子の解明および細胞局在の制御</p> <p>病態情報薬学分野ではこれまでに、マウス線維芽細胞株 NIH3T3 とマウスインスリノーマ株 MIN6 を混合した NIH3T3/MIN6 スフェロイドにおいて、NIH3T3 が中心部に、MIN6 がその周囲に局在することを見出している。申請者は、この局在化機構を解明するとともに、この機構に基づき細胞外基質の利用によるスフェロイド中の細胞の位置制御を試みた。NIH3T3/MIN6 スフェロイドの形成過程の観察により、細胞遊走により細胞がスフェロイド中で局在することを見出した。また、遊走阻害剤を用いた検討により、NIH3T3 の FAK シグナルを介した細胞外基質への指向的遊走が細胞局在に関与することを明らかにした。そこで、NIH3T3 のスフェロイド外側への遊走を誘導し局在を変化させるために、コラーゲン I をコーティングしたマイクロウェル中で NIH3T3/MIN6 スフェロイドを作製した結果、2 種の細胞がランダムに分布した NIH3T3/MIN6 スフェロイドを得ることに成功した。</p> <p>第2章 持続的酸素供給システム開発による細胞スフェロイドの高機能化</p> <p>細胞スフェロイドは、細胞が密に凝集した構造体であるため、スフェロイド周囲で酸素が過度に消費されるとともに、スフェロイド内部への酸素の透過性も乏しい。そのため、スフェロイド内部は低酸素環境となり、細胞の機能低下および細胞死が生じる。申請者は、①酸素生成マイクロウェルの開発、②スフェロイドへのゼラチン微粒子（GMS）の内包により、スフェロイド内部への酸素供給の向上による細胞スフェロイドの高機能化を試みた。</p> <p>第1節 酸素生成マイクロウェルの開発</p> <p>過酸化カルシウム（CaO₂）は水と反応して酸素を生成する。申請者は、マイクロウェルに CaO₂ を混合することで、スフェロイドに酸素を持続的に供給可能な酸素生成マイクロウェルを開発した。作製した酸素生成マイクロウェルを用いることでヒト肝がん細胞株 HepG2 スフェロイド培養液中の酸素濃度は上昇し、スフェロイド中細胞生存率は向上した。</p> <p>第2節 ゼラチン微粒子内包細胞スフェロイドの開発</p> <p>ゼラチンハイドロゲルは網目状構造を持つため酸素を透過する。申請者は、ゼラチンハイドロゲルを微粒子化した GMS をスフェロイドに内包することで、酸素の透過経路の形成によるスフェロイド内部への酸素透過性の改善を試みた。エマルション法により作製した直径 10～100 μm の GMS を混合することで HepG2 スフェロイドの低酸素環境が改善し、細胞の生存率も向上した。</p>			

第 3 章 塩基性繊維芽細胞増殖因子搭載メタクリル酸修飾ゼラチン粒子を内包した脂肪由来間葉系幹細胞スフェロイドの開発

創傷治療には、創傷治療関連因子を産生する脂肪由来間葉系幹細胞（ASC）の利用が期待されている。ASC を用いた治療においては、ASC のスフェロイド化により創傷治療関連因子の発現が向上すること、塩基性繊維芽細胞増殖因子（bFGF）が ASC の細胞増殖およびアポトーシス抵抗性を向上することから、スフェロイド化と bFGF との組み合わせが有効と考えた。しかしながら、bFGF は生体内安定性が低いことと、スフェロイドの密な構造のために内部の細胞への送達が困難なことが課題となる。申請者は、bFGF を徐放化する GMS をスフェロイドに内包することで、上記課題が解決できると考え、ASC スフェロイド内部より bFGF を徐放化させるシステムの開発を試みた。従来のエマルジョン法を用いた GMS 作製法ではタンパク質の失活過程を含むことから、水性二相分離法（w/w 法）とメタクリル酸修飾ゼラチンを用いることで、粒子形成と同時に bFGF を搭載可能な bFGF 搭載メタクリル酸修飾ゼラチン粒子（bFGF-w/w mGMS）の開発を試みた。w/w 法による粒子形成後、紫外線照射によりメタクリル酸を架橋し安定化することで、直径十数 μm の mGMS を得た。bFGF-w/w mGMS は、従来法で作製した bFGF 搭載 GMS と比較して搭載効率および徐放性が向上した。bFGF-w/w mGMS と ASC を混合して作製したスフェロイドは、w/w mGMS 非内包群および bFGF 非搭載 w/w mGMS 群と比較して、スフェロイド内部における ASC の生存率および創傷治療関連因子の遺伝子発現量が向上した。

以上、申請者は、スフェロイド培養環境および内部の微小環境に着目し、細胞外基質の利用、効率的な酸素供給のための工夫、bFGF 搭載ゼラチン微粒子の添加により、細胞分布の制御、細胞生存率および細胞機能の向上に成功した。本研究で得られた知見は、疾患治療および組織モデルに利用可能な高機能細胞スフェロイドの開発に有用な知見を提供するものと考えている。

(論文審査の結果の要旨)

細胞凝集体である細胞スフェロイドは、その内部で生体組織と同様に細胞—細胞間相互作用および細胞—細胞外基質間相互作用が生じ、細胞本来の機能が発揮されることから、細胞移植治療や組織モデルとしての応用が期待されている。その一方で、既存の細胞スフェロイドでは、複数種類の細胞で構成される混合細胞スフェロイドにおける細胞の位置が制御されていないこと、内部への酸素や栄養の送達が不十分なことなどの問題がある。そこで申請者は、高機能細胞スフェロイドの開発を目的に、細胞スフェロイド内外の微小環境に着目し、これを制御することで上記課題の解決を試みた。

第 1 章 混合細胞スフェロイド中の細胞局在決定因子の解明および細胞局在の制御

申請者は、マウス線維芽細胞株 NIH3T3 とマウスインスリノーマ株 MIN6 を混合した NIH3T3/MIN6 スフェロイドの局在化機構を解明するとともに、この機構に基づき細胞外基質の利用によるスフェロイド中の細胞の位置制御を試みた。NIH3T3/MIN6 スフェロイドの形成過程の観察により、細胞遊走により細胞がスフェロイド中で局在することを見出した。また、遊走阻害剤を用いた検討により、NIH3T3 の FAK シグナルを介した細胞外基質への指向的遊走が細胞局在に關与することを明らかにした。そこで、NIH3T3 のスフェロイド外側への遊走を誘導し局在を変化させるために、コラーゲン I をコーティングしたマイクロウェル中で NIH3T3/MIN6 スフェロイドを作製した結果、2 種の細胞がランダムに分布した NIH3T3/MIN6 スフェロイドを得ることに成功した。

第 2 章 持続的酸素供給システム開発による細胞スフェロイドの高機能化

①酸素生成マイクロウェルの開発、②スフェロイドへのゼラチン微粒子 (GMS) の内包により、スフェロイド内部への酸素供給の向上による細胞スフェロイドの高機能化を試みた。

第 1 節 酸素生成マイクロウェルの開発

マイクロウェルに過酸化カルシウム (CaO₂) を混合することで、スフェロイドに酸素を持続的に供給可能な酸素生成マイクロウェルを開発した。作製した酸素生成マイクロウェルを用いることでヒト肝がん細胞株 HepG2 スフェロイド培養液中の酸素濃度は上昇し、スフェロイド中細胞生存率は向上した。

第 2 節 ゼラチン微粒子内包細胞スフェロイドの開発

ゼラチンハイドロゲルを微粒子化した GMS をスフェロイドに内包することで、酸素の透過経路の形成によるスフェロイド内部への酸素透過性の改善を試みた。エマルション法により作製した直径 10~100 μm の GMS を混合することで HepG2 スフェロイドの低酸素環境が改善し、細胞の生存率も向上した。

第 3 章 塩基性繊維芽細胞増殖因子搭載メタクリル酸修飾ゼラチン粒子を内包した脂肪由来間葉系幹細胞スフェロイドの開発

塩基性繊維芽細胞増殖因子 (bFGF) 徐放化する GMS をスフェロイドに内包することで、ASC スフェロイド内部より bFGF を徐放化させるシステムの開発を試みた。従来のエマルシ

オン法を用いた GMS 作製法ではタンパク質の失活過程を含むことから、水性二相分離法（w/w 法）とメタクリル酸修飾ゼラチンを用いることで、粒子形成と同時に bFGF を搭載可能な bFGF 搭載メタクリル酸修飾ゼラチン粒子（bFGF-w/w mGMS）の開発を試みた。w/w 法による粒子形成後、紫外線照射によりメタクリル酸を架橋し安定化することで、直径十数 μm の mGMS を得た。bFGF-w/w mGMS は、従来法で作製した bFGF 搭載 GMS と比較して搭載効率および徐放性が向上した。bFGF-w/w mGMS と ASC を混合して作製したスフェロイドは、w/w mGMS 非内包群および bFGF 非搭載 w/w mGMS 群と比較して、スフェロイド内部における ASC の生存率および創傷治療関連因子の遺伝子発現量が向上した。

以上、本研究で得られた知見は、疾患治療および組織モデルに利用可能な高機能細胞スフェロイドの開発に有用な知見を提供するものと考えられる。よって、本論文は博士（薬学）の学位論文として価値あるものと認める。また、令和 2 年 2 月 14 日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。