

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

要約

2019

水上 優哉

目次

総論の部

緒言	1
第一章 混合細胞スフェロイド中の細胞局在に影響を及ぼす因子の解明および細胞局在の制御	3
1.1 NIH3T3/MIN6 スフェロイド中の細胞配置の解析	
1.2 NIH3T3 と MIN6 の混合細胞スフェロイド中局在形成能の評価	
1.3 NIH3T3/MIN6 スフェロイド中細胞局在の経時的観察	
1.4 NIH3T3/MIN6 スフェロイド中の局在形成機構の評価	
1.5 NIH3T3/MIN6 スフェロイド中の細胞遊走誘導シグナルの解明	
1.6 NIH3T3 と MIN6 の collagen I に対する遊走能の評価	
1.7 Collagen I コーティングマイクロウェルを用いて作製した NIH3T3/MIN6 スフェロイド内細胞配置評価	
1.8 考察	
第二章 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	14
第一節 酸素生成マイクロウェルの開発	16
第二節 ゼラチン微粒子内包細胞スフェロイドの開発	17
第三章 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微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	18
結論	20
謝辞	22
実験の部	
第一章 実験の部	23
引用文献	27

総論の部

緒言

ここ十数年の幹細胞分化培養技術の進歩は、医療応用を目的とした細胞研究を大きく発展させた。中でも、山中伸弥らが 2006 年に報告した人工多能性幹細胞 (iPSCs) 研究¹は、細胞移植による再生医療の実現および患者由来細胞を用いた病態解析の可能性を拡大した。また、2009 年には、当時のアメリカ合衆国大統領であったオバマ氏が、倫理的観点から規制されていた胚性幹細胞 (ESCs) 研究の規制を医療の発展のために緩和した。これらの背景をもとに、2010 年には脊髄損傷に対して ESCs 由来のオリゴデンドロサイトを移植した、初めての多能性幹細胞を用いた臨床試験が行われた。それに続くように同年には加齢黄斑変性症に対し、ESCs 由来の色素網膜上皮細胞を移植する臨床試験が行われている。iPSCs に関しても、2013 年には iPSCs 由来の色素網膜上皮細胞を加齢黄斑変性症患者に移植する臨床試験が行われ、その後パーキンソン病患者に対する iPSCs 由来の神経細胞移植や、角膜損傷患者に対する iPSCs 由来の角膜細胞の移植が行われている^{2,3}。多能性幹細胞は、病態解析や薬物スクリーニングにも用いられている⁴。患者由来の iPSCs を疾患に関与する種類の細胞に分化させ、健常者の iPSCs から分化させた細胞と比較することで、病態の原因を解析することが可能となった。同様に、患者由来 iPSCs から分化させた細胞を用いて薬物スクリーニングを行うことで、標的細胞に効率的に作用する化合物の探索が可能となった。このように多能性幹細胞分野の発展により、細胞治療や細胞を用いた病態モデルの作製が注目されている。

多能性幹細胞から様々な種類の細胞への分化方法が確立されたことにより、分化した細胞の本来の機能を最大限に引き出すことの重要性が高まっている。これまでの細胞研究では、その簡便さから懸濁状態の細胞や単層培養細胞が主に用いられてきた。しかしながら、多くの細胞は生体内において細胞-細胞間相互作用および細胞-細胞外基質間相互作用を介して三次元構造を形成している。これらの相互作用は、組織を構築するだけでなく、細胞機能にも大きく影響を与えることが明らかとされている。したがって、相互作用が起きにくい懸濁状態や単層培養の細胞では、生体内での状態を反映していないために、細胞機能を十分に発揮できず、細胞移植や組織モデルへの応用には不十分であった。これらの問題を解決する方法として細胞の組織化が挙げられる。細胞スフェロイドは、細胞を三次元培養することにより得られる細胞の凝集体である。スフェロイド内部では、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やすいために、生体に近い環境の中で細胞本来の機能を発揮可能である。これまでも、様々な細胞種において細胞スフェロイド化により高い治療効果を誘導した報告⁵や、組織モデルとして薬物スクリーニングに応用した報告^{6,7}がなされている。また近年は、単一の細胞だけでなく複数の

種類の細胞を混合した混合細胞スフェロイドなど、生体環境をより高度に模倣した細胞スフェロイドも報告されている⁸⁻¹⁰。

生体組織は、細胞が三次的に凝集しているのみならず、細胞が規則的に整列し高次構造を保つことにより組織としての機能を発揮している。一方で、混合細胞スフェロイドにおいては、スフェロイド内部における細胞の配置は無秩序に形成される。細胞スフェロイド内部の細胞配置は細胞間の相互作用を変化させて細胞機能に影響を与えるとともに、細胞スフェロイドの内外といったトポロジー的な違いが細胞機能を低下させる恐れがある。また、生体と異なる細胞配置をとるスフェロイドは、組織モデルとしては適当ではない。しかしながら、混合細胞スフェロイド内部の細胞配置を制御する報告はなく、混合細胞スフェロイド中の細胞配置の決定因子に関する報告例もほとんどない。そのため、生体により近い混合細胞スフェロイドを作製するためには、細胞スフェロイド中の細胞配置を決定する因子を解明するとともに、細胞配置の制御法の開発が必要である。また、生体組織では毛細血管内を流れる血液を介して、酸素や栄養分が絶え間なく供給されることで細胞機能が維持されている。しかしながら、細胞スフェロイドでは血管構造がなく細胞が密に凝集しているため、スフェロイド内部に酸素が十分には供給されない。細胞スフェロイド内部における酸素濃度の低下は、細胞の機能を低下させるとともに、細胞死を起こす。そのため、細胞機能を維持した高機能細胞スフェロイドを作製するためには、細胞スフェロイド内部に効率的に酸素や細胞を活性化する薬物を供給する必要がある。以上のことから、より高機能な細胞スフェロイドを構築するためには、混合細胞スフェロイド中の細胞配置の制御法の開発、および細胞スフェロイド内部への酸素、薬物の供給法の開発が必要である。そこで本研究では、混合細胞スフェロイド中の細胞局在に影響を及ぼす因子を解明することで細胞局在を制御したスフェロイドの開発、およびスフェロイドへの酸素供給システムの開発、そして細胞スフェロイド内部に薬物を徐放化するシステムの開発を試みた。

以下、本研究で得られた結果を三章にわたり論述する。

第一章 混合細胞スフェロイド中の細胞局在に影響を及ぼす因子の 解明および細胞局在の制御

胚性幹細胞 (ESCs) や人工多能性幹細胞 (iPSCs) をはじめとする多能性幹細胞研究の発展に伴い、これら細胞の再生医療への応用性が拡大している^{2,11}。幹細胞由来の機能性細胞を含む人工組織は、細胞移植治療への応用や、組織モデルとしての薬物スクリーニングへの応用が期待される⁴。三次元の人工組織中で細胞は、その機能を十分に発揮するために適切な配置をとる必要がある。これまでもオルガノイドなどの人工組織を形成するための様々な組織工学技術が開発されてきているが、細胞の自発的な増殖、分化、組織化により高次な構造を形成するため、大量培養には大きなコストや期間を要し、疾患治療や薬物スクリーニングへの応用にはいまだに壁がある¹²⁻¹⁴。そのため、より簡便に細胞の配置を制御し組織化された人工組織の作製法が必要である。

細胞スフェロイドは、非接着条件下で細胞を互いに接着させて形成した三次元の細胞凝集体である¹⁵。細胞スフェロイド中では、単層培養や懸濁状態の細胞と比較して、細胞-細胞間相互作用や、細胞-細胞外基質間相互作用が効率的に生じるため、細胞機能が向上するとともに、より生体に近い環境になること、またオルガノイド等の人工組織と比較して簡便に作成が可能であることから、細胞移植や組織モデルとして応用される¹⁶。これまでも、間葉系幹細胞や肝細胞、膵 β 細胞を用いた検討において、細胞のスフェロイド化により生体に移植後の生着率や細胞機能の向上が報告されている¹⁷⁻¹⁹。さらには、二種類以上の細胞を混合することで、より高い機能を持つ細胞スフェロイドを作製することも可能である。これまでに、血管内皮細胞または線維芽細胞を膵 β 細胞と混合した混合細胞スフェロイドを作製することで、膵 β 細胞からのインスリン産生量が向上することや、肝細胞と間葉系幹細胞から成る混合細胞スフェロイドを作製することで肝細胞からのアルブミン産生量や代謝活性が向上することが報告されている^{10,20}。

生体では多種類の細胞によって組織が構成されるだけでなく、それらの細胞配置も制御されており、組織が生理学的機能を果たすためには細胞配置も重要である。一方で、混合細胞スフェロイド中の細胞配置は無秩序に形成される。細胞スフェロイド中の細胞配置の違いは、細胞-細胞間相互作用を変化させ細胞機能に影響を与えられられる。そのため、混合細胞スフェロイド中の細胞配置も細胞機能を制御するためには重要な因子と考えられるとともに、細胞配置が制御された混合細胞スフェロイドは、薬物スクリーニングのためのより適切な組織モデルとしての応用や、細胞移植におけるより高機能な細胞スフェロイドとしての応用が期待される。

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 とマウスインスリンノーマ株 MIN6 を混合した NIH3T3/MIN6 スフェロイド中で、NIH3T3 が中心部に、MIN6 がそれを取り囲むように局在することを見出している¹⁰。これに対して、実際の膵島では、膵 β

細胞の周りを線維芽細胞などの間質細胞が囲む配置である²¹。これまでに、細胞スフェロイドを作製するための様々な方法が開発されてきたものの、混合細胞スフェロイドにおける細胞配置の形成メカニズムは不明であり、細胞配置を制御する方法はない。

そこで第一章では、スフェロイド内部で内側（コア）と外側（シェル）に明確に局在する NIH3T3/MIN6 スフェロイドを選択し、三次元的な細胞配置解析を行うとともに、タイムラプス撮影により細胞配置が形成される過程を観察した。さらに、各種阻害薬を用いることで細胞局在の形成メカニズムを解明するとともに、得られた知見をもとに細胞配置の異なる混合細胞スフェロイドの作製を試みた。

1.1 NIH3T3/MIN6 スフェロイド中の細胞配置の解析

ポリジメチルシロキサン（PDMS）製マイクロウェル中で NIH3T3 と MIN6 を混合して作製した混合細胞スフェロイド（NIH3T3/MIN6 スフェロイド）の明視野写真を Fig. 1A に示す。得られたスフェロイド中の総細胞数は 5830 ± 690 cells であった。DiI にて標識した NIH3T3（DiI-NIH3T3）と、CFSE にて標識した MIN6（CFSE-MIN6）を用いて作製した DiI-NIH3T3/CFSE-MIN6 スフェロイドをトリプシンにより崩壊し、フローサイトメトリー法により細胞比を測定した結果、細胞比は NIH3T3:MIN6=52.6:47.4 であった。DiI-NIH3T3 と CFSE-MIN6 を同時にマイクロウェルに播種し、24 時間後に透明化処理を行い、共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ、DiI-NIH3T3 がコアに、CFSE-MIN6 がシェルに局在する像が得られた（Fig. 1B）。Fig. 1C に示す visual scoring を用いて細胞配置を定量的に評価したところ、NIH3T3 がコアかつ MIN6 がシェルのカテゴリー I または II の細胞配置を示すスフェロイドが 100 個中 99 個であった（Fig. 1D）。

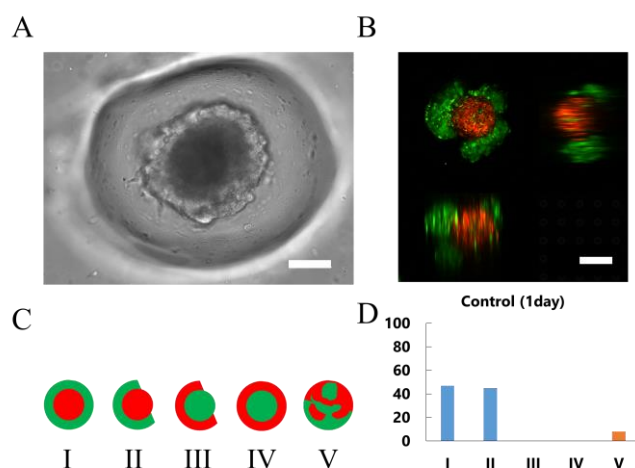


Figure 1. Core-shell-type distribution of MIN6 and NIH3T3 cells in mixed multicellular spheroids. (A) An image of a NIH3T3/MIN6 spheroid in a microwell after 72 h of incubation. Scale bar = 100 μ m. (B) Three-dimensional fluorescence images of a NIH3T3/MIN6 spheroid after optical clearing. Top left, top right, and bottom left images show x-y, y-z, and z-x views, respectively. Scale bar = 100 μ m. (C) Five categories of cellular distribution patterns in NIH3T3/MIN6 spheroids. Green, MIN6; red, NIH3T3. (D) Cellular distribution patterns of NIH3T3/MIN6 spheroids. One hundred spheroids were categorized by visual scoring.

1.2 NIH3T3 と MIN6 の混合細胞スフェロイド中局在形成能の評価

混合細胞スフェロイド中における NIH3T3 のコアへの局在の普遍性を評価するために、CFSE 標識したマウス筋線維芽細胞株 C2C12、マウス線維芽細胞株 3T3L1、マウス結腸癌細胞株 colon26、ヒト肝がん細胞株 HepG2、マウス血管内皮細胞株 MAEC を選択し、DiI-NIH3T3 との混合細胞スフェロイドを作製し、スフェロイド中の細胞配置を評価した (Fig. 2 上段)。その結果、DiI-NIH3T3 は、CFSE 標識 HepG2、MAEC と混合した際に細胞スフェロイドのコアに局在した。一方で、CFSE 標識 C2C12、3T3L1、colon26 の場合はランダムな細胞配置を示した。続いて、CFSE-MIN6 についても同様の検討を行った (Fig. 2 下段)。CFSE-MIN6 は、DiI 標識 C2C12、3T3L1 と混合した際に細胞スフェロイドのシェルに局在し、DiI 標識 colon26、HepG2、MAEC と混合した際、ランダムな細胞配置を示した。以上の結果より、NIH3T3 および MIN6 はそれぞれスフェロイドのコアとシェルに局在する傾向を持つこと、細胞の組み合わせにより細胞スフェロイド中の細胞配置が決定されることが示唆された。

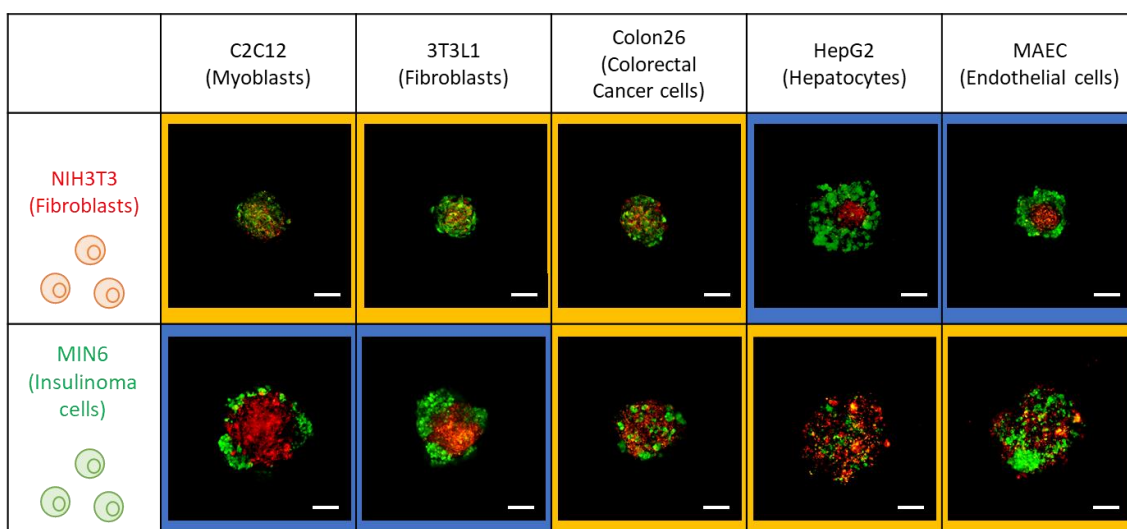


Figure 2. NIH3T3 and MIN6 cells localized to the core and shell regions, respectively, of mixed multicellular spheroids. Fluorescence images of mixed multicellular spheroids containing DiI-labeled and CFSE-labeled cells after 72 h of incubation. Upper panels: DiI-labeled NIH3T3 mixed with CFSE-labeled C2C12, 3T3L1, Colon26, HepG2, or MAEC cells. Lower panels: CFSE-labeled MIN6 cells mixed with DiI-labeled C2C12, 3T3L1, Colon26, HepG2, or MAEC cells. Scale bar = 100 μ m.

1.3 NIH3T3/MIN6 スフェロイド中細胞局在の経時的観察

NIH3T3/MIN6 スフェロイドのコアシェル型の局在の形成機構を解明するために、マイクロウェル中での局在の形成過程をタイムラプス観察により評価した。DiI-NIH3T3 と CFSE-MIN6 細胞を播種した直後には、両細胞が細胞スフェロイド内部でランダムに分布する様子が観察された (Fig. 3A, 0 h)。その後、経時的に同じ細胞同士が集団を形成する様子

が観察され、24 時間後には DiI-NIH3T3 がスフェロイドのコアに、CFSE-MIN6 がシェルに局在した (Fig. 3A, 24 h)。続いて、あらかじめ CFSE-MIN6 だけで作製したスフェロイドに、DiI-NIH3T3 を添加したときの様子をタイムラプス撮影した。播種直後においては、CFSE-MIN6 スフェロイドの周囲を DiI-NIH3T3 が取り囲む様子が観察されたものの、次第に DiI-NIH3T3 が CFSE-MIN6 スフェロイドに浸潤するとともに、CFSE-MIN6 がスフェロイドの外側へ移動する様子が観察された。そして、48 時間後には DiI-NIH3T3 がスフェロイドのコアに局在し、CFSE-MIN6 がシェルに局在した (Fig. 3B)。一方で、あらかじめ DiI-NIH3T3 だけで作製したスフェロイドに CFSE-MIN6 を播種した場合は、播種直後に CFSE-MIN6 が DiI-NIH3T3 スフェロイドの周囲を取り囲んだのち、細胞配置は変化しなかった (Fig. 3C)。これらの結果より、細胞スフェロイド内部で NIH3T3 と MIN6 が指向的に移動することで、コアシェル型の局在が形成されることが示唆された。

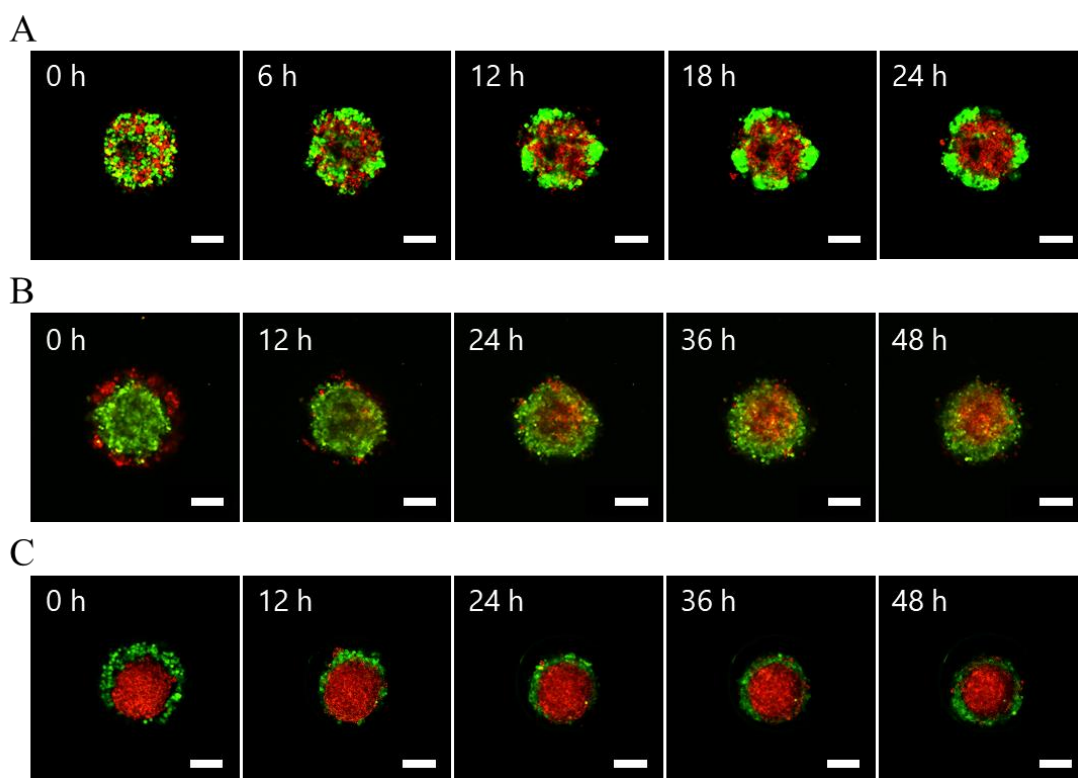


Figure 3. NIH3T3 and MIN6 cells migrated to the core and shell regions, respectively, of mixed multicellular spheroids. (A–C) Time-lapse fluorescence microscopy images of DiI-labeled NIH3T3/CFSE-labeled MIN6 spheroids. (A) Both the cell types were simultaneously added to the microwells. (B) Addition of DiI-labeled NIH3T3 cells to preformed CFSE-labeled MIN6 spheroids. (C) Addition of CFSE-labeled MIN6 cells to preformed DiI-labeled NIH3T3 spheroids. Scale bars = 100 μ m.

1.4 NIH3T3/MIN6 スフェロイド中の局在形成機構の評価

NIH3T3/MIN6 スフェロイド中の局在形成機構には、指向性のある細胞遊走が関与しているとの仮説を立て、これを検証するために細胞遊走阻害薬存在下において NIH3T3/MIN6 スフェロイドを作製し、スフェロイド内の細胞配置を評価した。アクチン重合阻害により仮足形成を阻害することで細胞遊走を阻害する cytochalasin D を添加したところ、DiI-NIH3T3/CFSE-MIN6 スフェロイドはランダム型の細胞配置を示した (Fig. 4A)。ROCK 阻害により細胞の収縮力を低下させることで、遊走速度を低下させる Y-27632 存在下では、スフェロイド形成 24 時間後の時点で不完全なコアシェル型の細胞局在が観察された。また、visual scoring では、NIH3T3 がコア、MIN6 がシェルの細胞局在を示すスフェロイドの割合が、薬剤非処理群では 99%であったのに対し、cytochalasin D 処理群では 32%、Y-27632 処理群では 41%に低下した (Fig. 1D, Fig. 4C)。以上の結果より、NIH3T3/MIN6 スフェロイド中のコアシェル型の細胞局在の形成には、NIH3T3 と MIN6 の指向性のある細胞遊走が関与することが示唆された。

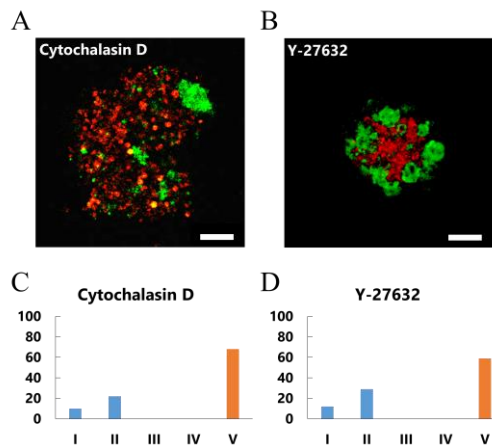


Figure 4. Forming NIH3T3-core/MIN6-shell distribution was inhibited by cellular migration inhibitors. (A and B) Fluorescence images of DiI-labeled NIH3T3/CFSE-labeled MIN6 spheroids prepared using (A) cytochalasin D-treated or (B) Y-27632-treated cells. Scale bars = 100 μ m. (C and D) Cellular distribution patterns of NIH3T3/MIN6 spheroids prepared by using microwells with (C) cytochalasin D or (D) Y-27632. One hundred spheroids were categorized by visual scoring.

1.5 NIH3T3/MIN6 スフェロイド中の細胞遊走誘導シグナルの解明

指向性のある細胞遊走は、ケモカインや成長因子、細胞外基質によって誘導される²²。これらの因子は細胞膜上に発現する受容体に結合することで、仮足形成を促し指向性のある細胞遊走を誘導する。そこで、指向性のある細胞遊走の関連因子の阻害薬を用いることで、NIH3T3/MIN6 スフェロイド中の細胞局在の決定因子の同定を試みた。 G_i タンパク質の阻害薬である百日咳毒素、JAK/STAT シグナルの阻害薬である Janus kinase (JAK) inhibitor I で細胞を処理した場合には、細胞スフェロイド中の細胞配置に変化は見られなかった (Fig. 5A, 5B, 5D)。一方で、focal adhesion kinase (FAK) の阻害薬である FAK inhibitor 14 で処理したところ、NIH3T3/MIN6 スフェロイド中のコアシェル型の細胞局在は解消した (Fig. 5C, 5D)。続いて、FAK inhibitor 14 で別々に処理した DiI-NIH3T3 と CFSE-MIN6 を用いて作製

した DiI-NIH3T3/CFSE-MIN6 スフェロイド中の細胞配置を観察した。DiI-NIH3T3 を FAK inhibitor 14 で処理した場合、CFSE-MIN6 がコア、DiI-NIH3T3 がシェル of 細胞配置を示したスフェロイドが 37%、ランダム型の細胞配置を示したスフェロイドが 63%であった。また、両細胞を FAK inhibitor 14 で前処理した時、すべてのスフェロイドがコアシェル型の細胞局在を示した。一方で、MIN6 のみを FAK inhibitor 14 で処理しても、DiI-NIH3T3/CFSE-MIN6 スフェロイド中の細胞配置には影響を与えなかった。これらの結果より、NIH3T3 中の FAK シグナルが NIH3T3/MIN6 スフェロイド中の細胞局在の形成に寄与していることが明らかとなった。

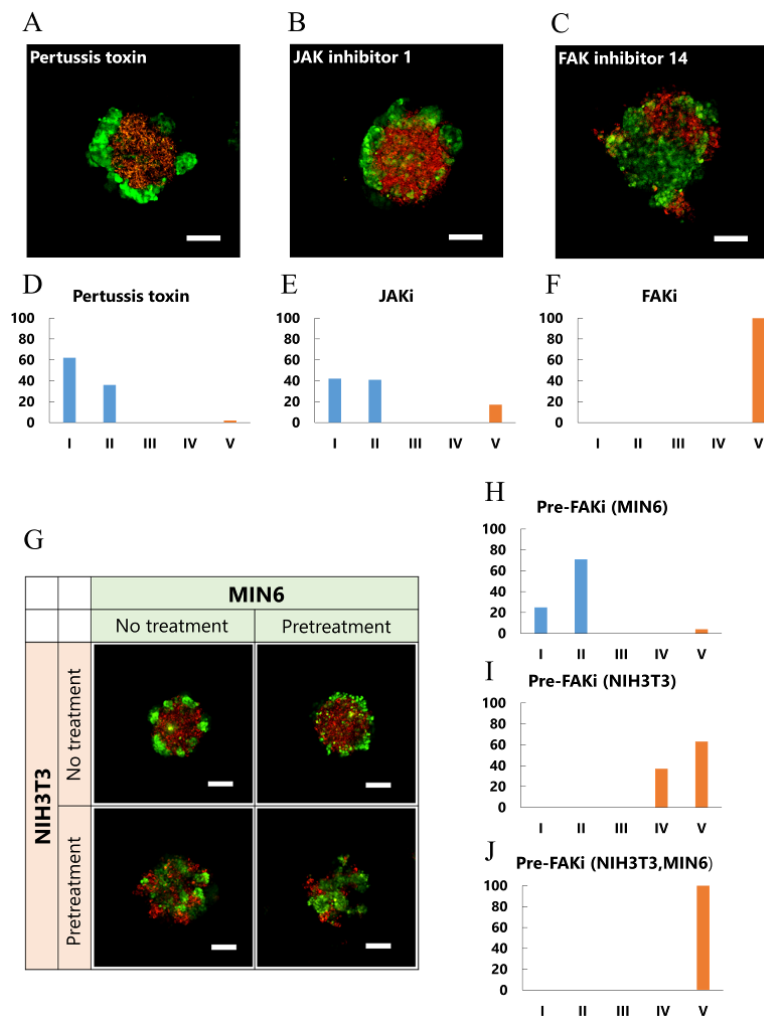


Figure 5. FAK signal in NIH3T3 cells mediates the core-shell-type distribution in NIH3T3/MIN6 spheroids. (A–C) DiI-labeled NIH3T3/CFSE-labeled MIN6 spheroids were prepared in the presence of inhibitors of pseudopod formation. (A) Pertussis toxin, (B) JAK inhibitor 1, and (C) FAK inhibitor 14. Scale bar = 100 μ m (D–F) Cellular distribution patterns of NIH3T3/MIN6 spheroids prepared by using microwells with (C) pertussis toxin, (D) JAK inhibitor 1 or (F) FAK inhibitor 14. One hundred spheroids were categorized by visual scoring. (G) DiI-labeled NIH3T3 cells and CFSE-labeled MIN6 cells were separately treated with FAK inhibitor 14 before spheroid formation. Scale bar = 100 μ m. (H–J) Cellular distribution patterns of NIH3T3/MIN6 spheroids prepared by using non-treated NIH3T3 cells and FAKi-pretreated MIN6 cells (H), FAKi-pretreated NIH3T3 cells and non-treated MIN6 cells (I), or FAKi-pretreated NIH3T3 and FAKi-pretreated MIN6 cells (J). One hundred spheroids were categorized by visual scoring.

1.6 NIH3T3 と MIN6 の collagen I に対する遊走能の評価

FAK シグナルは細胞表面の integrin に細胞外基質が結合することで誘起される²³。そのため、NIH3T3/MIN6 スフェロイド形成環境に細胞外基質を添加することで細胞スフェロイド内部の細胞配置を変えることができると考えられる。細胞外基質の一つである collagen I は、細胞膜に発現する特定の α 、 β サブユニットが二量体を形成した integrin との相互作用を介して FAK シグナルを誘起する。そこでまず、collagen I と相互作用する integrin を同定するために、collagen I との相互作用に参与する integrin サブタイプである integrin $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 10$ 、 $\alpha 11$ 、 $\beta 1$ の NIH3T3 と MIN6 における mRNA 発現を評価した (Fig. 6A)。その結果、integrin $\beta 1$ は NIH3T3 と MIN6 の両細胞で高レベルに発現しており、integrin $\alpha 11$ は、NIH3T3 のみに発現していた。そして、integrin $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 10$ は両細胞でほとんど発現していなかった。次に、NIH3T3 と MIN6 の collagen I に対する遊走能を遊走アッセイにて評価した (Fig. 6B)。その結果、NIH3T3 は MIN6 と比較して collagen I に対する遊走能が有意に高いことが示された。これらの結果より、collagen I を用いることで NIH3T3/MIN6 スフェロイド中で NIH3T3 のみが指向性を示す遊走を誘導できる可能性が示された。

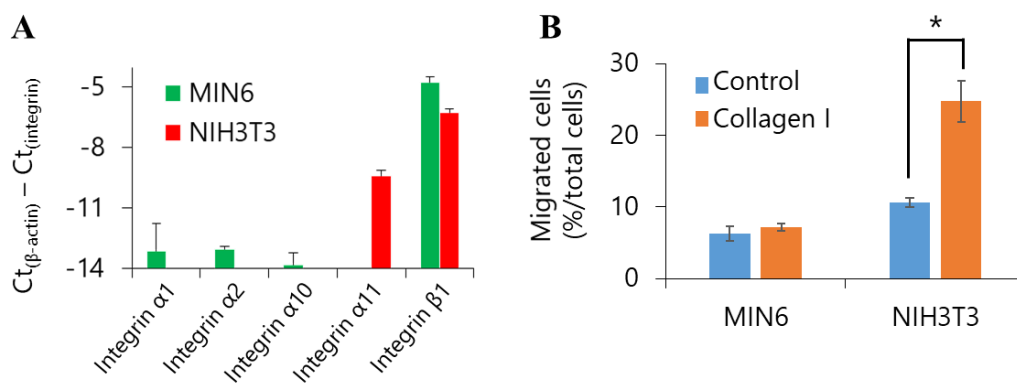


Figure 6. NIH3T3-collagen I interaction induced cellular migration to collagen I. (A) The mRNA expression of genes encoding integrin subsets that interacted with collagen I in MIN6 and NIH3T3 cells was measured by performing qRT-PCR. Results are expressed as the mean \pm SD of three independent experiments. (B) Directional migration of MIN6 and NIH3T3 cells toward collagen I was evaluated by performing haptotaxis assay. Results are expressed as the mean \pm SD of three independent experiments. *P < 0.05.

1.7 Collagen I コーティングマイクロウェルを用いて作製した NIH3T3/MIN6 スフェロイド中の細胞配置評価

Collagen I を PDMS 製のマイクロウェルにコーティングすることにより、細胞スフェロイド形成環境のシェル側に collagen I を添加した培養環境で NIH3T3/MIN6 スフェロイドを作製し、細胞局在に与える影響を評価した。Collagen I をコーティングしたマイクロウェルを

用いた場合にも、NIH3T3/MIN6 スフェロイドが形成された (Fig. 7A)。得られた細胞スフェロイド中の細胞数は、 6090 ± 650 cells で、細胞比は NIH3T3:MIN6=47.0:53.0 であり、非コーティングの場合と比較してほとんど変化はなかった。DiI-NIH3T3 と CFSE-MIN6 を用いて DiI-NIH3T3/CFSE-MIN6 スフェロイドを作製し、共焦点顕微鏡を用いて 3 次元解析を行った結果、DiI-NIH3T3 と CFSE-MIN6 はスフェロイド中でランダム型の細胞配置を示した (Fig. 7B)。また、visual scoring では、ランダム型の細胞配置を示すスフェロイドが 47%であった (Fig. 7B)。続いて、指向性のある遊走が阻害されているかを確かめるために、collagen I コーティングマイクロウェル中での NIH3T3/MIN6 スフェロイド形成の様子をタイムラプス撮影した。播種直後は両細胞がランダムに分布する様子が観察されたが、非コーティングのマイクロウェルの場合とは異なり、DiI-NIH3T3 の移動はほとんど観察されず、48 時間後においてもランダム型の細胞配置を示した。これらの結果は、collagen I コーティングマイクロウェル中では、NIH3T3 の指向性を持った細胞遊走が阻害されたためと考えられた。

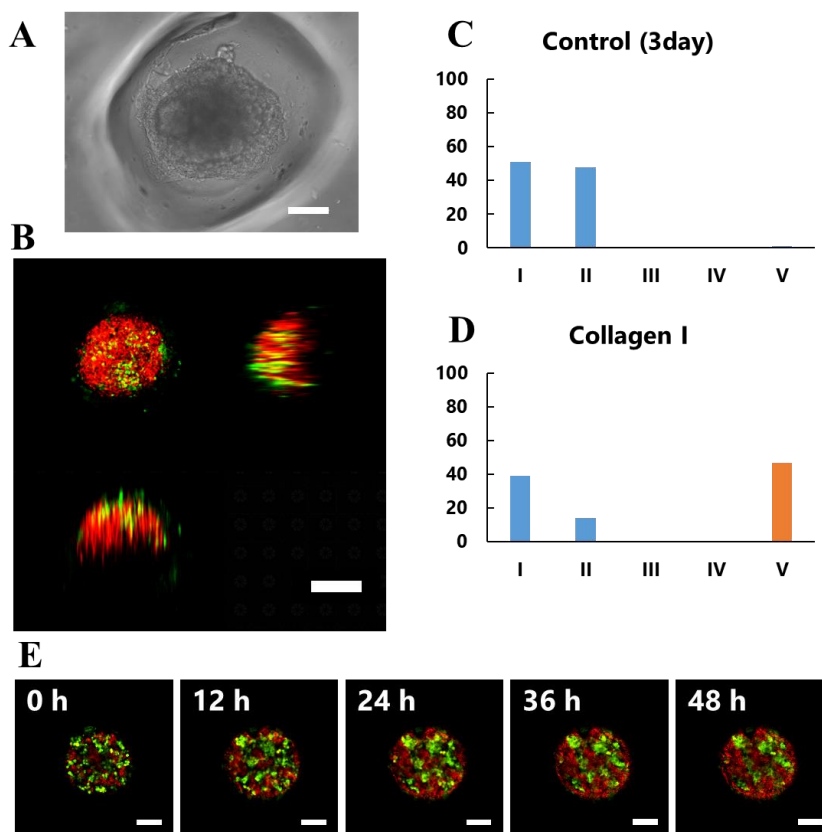


Figure 7. The core-shell-type distribution decreased in NIH3T3/MIN6 spheroids prepared in collagen I-coated microwells. (A) An image of a NIH3T3/MIN6 spheroid in a collagen I-coated microwell after 72 h of incubation. (B) A three-dimensional fluorescence image of a DiI-labeled NIH3T3/CFSE-labeled MIN6 spheroid in a collagen I-coated microwell after optical clearing. (C and D) Cellular distribution patterns of NIH3T3/MIN6 spheroids prepared by using (C) non-coated or (D) collagen I-coated microwells. One hundred spheroids were categorized by visual scoring. (E) Time-lapse fluorescence images of DiI-labeled NIH3T3/CFSE-labeled MIN6 spheroids in collagen I-coated microwells. Scale bar = 100 μ m.

1.8 考察

細胞治療において、より高い治療効果を得るためには、多種細胞からなる、複雑で、組織化された人工組織を作製する必要がある。肝臓や膵島や血管などの生体組織中で、細胞は同種や異種細胞間の相互作用および細胞外基質との相互作用を空間的に制御することで複雑な組織構造を形成し、その機能を保っている^{21,24,25}。そのため、人工組織においても、細胞の空間的な位置制御を行うことで細胞機能および組織としての機能を十分に引き出すことが重要と考えられる。

足場や三次元バイオプリンターの利用、細胞シートやオルガノイドなどの様々な細胞の組織化方法が開発されている^{13,26-28}。その中で、細胞のスフェロイド化は最も一般的な細胞組織化方法の一つである。細胞スフェロイドの作製は、簡便さや操作性、大量作製の点で他の方法よりも優れている。しかしながら、細胞スフェロイド作製法の多くでは、無秩序な細胞の自己組織化を介して三次元構造体を作製するため、スフェロイド内における細胞の配置を制御することはできない。本研究にて報告した collagen I をコーティングしたマイクロウェルを利用した方法では、細胞の遊走を制御することで NIH3T3/MIN6 スフェロイド中の細胞配置を変化させることが可能であった。これより、細胞スフェロイドの作製に適切な細胞外基質を足場として利用することで、細胞内の指向性のある遊走を制御し、細胞配置の制御が可能であることが示された。また、細胞外基質を用いて三次元組織中の細胞の遊走を制御する方法は、細胞スフェロイドの作製だけでなく、細胞シートや三次元バイオプリンターなどの他の組織工学的アプローチにも応用できると考えられる。

本研究の成果から、細胞の接着因子が混合細胞スフェロイド中の細胞配置に影響を与えることが示された。これまでも、Hsu らが、2種類の細胞を混合した細胞スフェロイド中の細胞配置の形成が、(1) A cells-scaffold materials (2) A cells-A cells (3) A cells-B cells (4) B cells-B cells (5) B cells-scaffold materials の5つの相互作用を介した接着力の強弱により決定されると報告している²⁹。しかしながら、本研究では接着の強弱ではなく、接着因子である integrin を介した FAK シグナルによる細胞遊走が NIH3T3/MIN6 スフェロイド中の細胞配置の決定に寄与していることを明らかとした。Integrin を介した細胞外基質との接着の強弱は、integrin と細胞外基質との接着点の数に依存する。integrin を介した細胞遊走では、細胞外基質濃度に依存して integrin との接着点が増加する方向に指向的な細胞遊走が誘起される²³。そのため、細胞遊走が起こった結果、移動した場所では、細胞外基質と細胞との強い相互作用が生じる。したがって、本研究で明らかにした細胞スフェロイド中における細胞配置の形成機構は、Hsu らが提唱する細胞配置の形成仮説につながる機構を示している。

本研究において、NIH3T3/MIN6 スフェロイドの形成過程で、integrin と細胞外基質の相互作用より誘導される FAK シグナルを介した NIH3T3 の中心部への細胞遊走の関与が示唆された。これまでに、FAK シグナルは細胞スフェロイドの形成にも関与していることが報告

されている。Linらは、肝がん細胞スフェロイド作製環境中に細胞外基質を添加することにより細胞同士の凝集が強くなることを報告している³⁰。また、特定の integrin サブタイプの発現が細胞同士の凝集に必要であることも報告されている³¹。以上の報告から、細胞スフェロイド中における FAK シグナルを介した NIH3T3 の内部への細胞遊走は、スフェロイド形成時の細胞の凝集過程に関与している可能性が考えられる。

FAK 阻害薬を用いた検討より、NIH3T3 中の FAK シグナルのみが NIH3T3/MIN6 スフェロイド中の細胞局在に関与することが示唆された。一方で、NIH3T3 のみを FAK 阻害薬で処理した場合には、MIN6 がコア、NIH3T3 がシェル配置が 100 個のスフェロイド中 37 個で観察された。この結果は、MIN6 もスフェロイド内部へと遊走することを示唆している。したがって、NIH3T3/MIN6 スフェロイドのコアに MIN6 が観察されなかったことは、NIH3T3 が細胞スフェロイド内部に遊走する際に MIN6 を外側に押し出しているためと考えられる。すなわち、NIH3T3 と MIN6 の細胞外基質に対する親和性の違いが、スフェロイド内部への細胞遊走を順位付けし、これに応じた細胞配置が形成されると考えられる。この仮説は、他の組み合わせの混合細胞スフェロイドにおける細胞配置にも当てはまる可能性がある。

以上の結果から、NIH3T3 は core-philic な細胞、MIN6 は shell-philic な細胞とみなすことが可能であり、このような core-philic と shell-philic の細胞の組み合わせの場合には、core-philic の細胞がコアに、shell-philic の細胞がシェルに局在すると考えられる。Fig. 2 の結果をもとに各細胞を分類すると、NIH3T3 と C2C12、3T3L1 は core-philic であり、MIN6 と HepG2、MAEC は shell-philic とみなすことができる。Core-philic 同士または shell-philic 同士の細胞を混合した場合には、ランダムな細胞配置を形成するものと考えられる。一方、Colon26 は、NIH3T3、MIN6 いずれと混合した場合にもランダムな細胞配置を示したことから、この細胞は明確な指向性がない (non-philic) ことが推察される。こうした分類は細胞外基質への親和性によって決定される可能性がある。Core-philic に分類される NIH3T3 と C2C12、3T3L1 はいずれも間質細胞であり、FAK シグナルを介して細胞外基質に強く引き寄せられる細胞である³²。

Collagen I コーティングマイクロウェルを用いることで、NIH3T3/MIN6 スフェロイド中のコアシェル型の細胞局在が緩和した。この結果は、NIH3T3 がマイクロウェル表面の collagen I に引き寄せられたためと考えられる。しかしながら、NIH3T3 はスフェロイドのシェル領域に完全には局在しなかった。そのため、NIH3T3 は collagen I コーティングマイクロウェルでスフェロイドを作製した場合にも、コア領域にも遊走したと考えられる。しかしながら、タイムラプス撮影では、collagen I コーティングマイクロウェル中で NIH3T3 はほとんど遊走しなかった。この結果より、NIH3T3 と collagen I との相互作用は、NIH3T3 のシェル領域への細胞遊走を誘起するのではなく、コア領域への細胞遊走を阻害する可能性がある。一般に、細胞スフェロイドは低接着性の表面を持つマイクロウェルを用いた場合に形成が促進されるため、細胞スフェロイド作製技術の多くでは細胞接着が抑制される条件が用いられている¹⁵。つまり、細胞接着可能な足場は、細胞スフェロイド形成時の細胞の凝集を抑

制すると考えられる。前述の通り、細胞スフェロイド形成過程における細胞の凝集には、細胞スフェロイドコアへの細胞遊走の関与が示唆されているため、細胞接着可能な collagen I コーティングマイクロウェルは細胞の凝集に関与するコア領域への遊走を抑制したと考えられる。

以上、第一章では、NIH3T3/MIN6 スフェロイド中に観察される NIH3T3 がコア、MIN6 がシェルの細胞局在が、NIH3T3 の FAK シグナルを介したスフェロイド内部への細胞遊走により形成されることを明らかにした。また、collagen I コーティングマイクロウェルを用いることで、コアシェル型の細胞局在を解消することに成功した。これらの結果から、混合細胞スフェロイド中に細胞外基質を添加することで、内部の細胞配置を制御できる可能性が示された。

第二章 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

細胞移植により効果的に治療効果を得るためには、移植する細胞の生細胞数と機能が重要である。例えば、1型糖尿病治療を目的とした膵島移植においては、血糖値をコントロールするために必要なインスリン量を得ることが必要であり、これは移植細胞の生着数とインスリン放出性に依存する。これまでに行われてきた膵島移植においても、十分な治療効果を得るための細胞数を用意すること、移植後の生着率を向上させることが課題とされている³³。多能性幹細胞研究の発展により、幹細胞を分化することで機能性細胞の簡便な調製が可能となった⁴。これにより、十分な細胞数を調製することが可能になったものの、懸濁状態の機能性細胞を移植する従来の方法では、移植後における生着および機能の維持は困難であった。そのため、低い生着率および機能の低下を考慮した時、治療効果を示す細胞数以上の細胞の調製が必要となり、そのコストが問題となる。細胞のスフェロイド化は、細胞の機能性および移植後の生着率を向上する手段として期待されている⁵。病態情報薬学分野ではこれまでに、膵島β細胞を細胞スフェロイド化することで、細胞のインスリン産生能および移植後の生着率を向上し、1型糖尿病モデルマウスを用いた治療実験において、懸濁状態の細胞と比較して高い血糖低下効果を明らかにしている¹⁹。

細胞スフェロイドのヒトへの治療応用には、大量の細胞スフェロイドの調製が必要となる。例えば、1型糖尿病治療では、治療の奏功には30万個の膵島が生着する必要があると報告されている³³。すなわち、細胞スフェロイドを用いて膵島と同様の機能ユニットを作製できたと仮定しても、30万個の細胞スフェロイドを調製する必要がある。マイクロウェルを用いて細胞スフェロイドを作製する方法は、non-adhesive surface 法や rotary 法、hanging drop 法などの他の細胞スフェロイド作製法と比較して、均一性および生産性に優れている^{34,35}。病態情報薬学分野ではこれまでも、膵島β細胞や肝細胞、マクロファージをマイクロウェル中で培養することで均一なサイズを持つ細胞スフェロイドを多数作製し、これらの細胞スフェロイドが細胞治療に応用可能であることを報告した^{10,19}。しかしながら、限られた培養空間中で細胞スフェロイドを大量に作製する方法は、培地中の溶存酸素を過度に消費するため酸素濃度の低下を及ぼす。さらに、細胞スフェロイド培養では、細胞が局所に集中して存在するため、細胞スフェロイド微小環境における酸素濃度はより低下すると考えられる。そして培養環境中の酸素濃度の低下は、細胞機能の低下、および細胞生存率の低下を招く可能性がある (Fig. 8)。

細胞スフェロイドは細胞が密に凝集した構造であり、これにより三次元的に細胞同士が相互作用を生じることで、細胞機能の向上に寄与している。一方で、細胞が密に凝集する構造は、スフェロイド中の酸素の透過性を低下させ、内部の低酸素環境形成の要因となる^{38,39}。細胞スフェロイド中の低酸素環境は、腫瘍組織の低酸素環境に類似するため腫瘍モデ

ルとしては有用である一方で、細胞治療への応用に際しては、細胞の機能や生着率を低下させる原因となりうる (Fig. 9)。

医療応用を目的とした細胞スフェロイドにおいては、治療効果を向上するために、細胞の機能および生存率を高く維持した状態で調製することが重要である。そのため、低酸素環境の原因となる、①培養環境中の酸素濃度の低下を環境要因、②細胞スフェロイド中の酸素透過性の低さを構造要因として、この2つの要因を解消することで高機能細胞スフェロイドが開発できると考えられる。

そこで第二章では、細胞スフェロイド培養環境における低酸素環境の改善を目的に、第一節では環境要因の解消を目的とした酸素生成マイクロウェルの開発について、第二節では構造要因の解消を目的としたゼラチン微粒子を内包する細胞スフェロイドの開発について論述する。

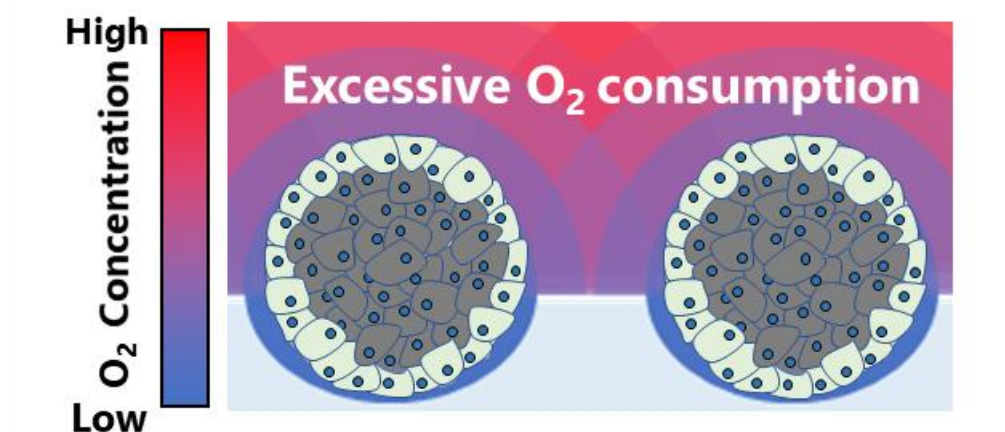


Figure 8. Excessive O₂ consumption, an environmental factor, reduces O₂ concentration in culture medium.

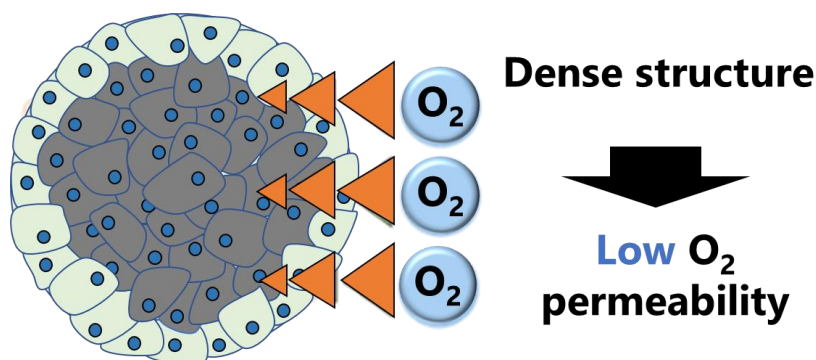


Figure 9. Dense structure, a structural factor, reduces O₂ permeability into the spheroid core and induces hypoxia.

第一節 酸素生成マイクロウェルの開発

Coronel らは、過酸化カルシウムをポリジメチルシロキサン (PDMS) に混合したマテリアルが酸素の持続的なジェネレーターとして有用であることを報告している⁴⁰⁻⁴²。PDMS 中で過酸化カルシウムは水と反応して過酸化水素を発生し、発生した過酸化水素は酸素と水に分解される。そのため、過酸化カルシウムを混合した PDMS をマイクロウェルに成形することで、細胞スフェロイド作製環境に持続的に酸素を供給可能な酸素生成マイクロウェルが開発でき、これにより環境要因を解消可能と考えられる。

そこで第二章第一節では、環境要因の解消を目的とした酸素生成マイクロウェルの開発および、酸素生成マイクロウェルを用いることで高機能細胞スフェロイドの開発を試みた。過酸化カルシウムを混合した PDMS 上に水を積層し、経時ごとに酸素濃度を測定した結果、3 日間に渡り持続的に、過酸化カルシウムの混合量に応じて酸素が発生した。そこで、過酸化カルシウムを混合した PDMS を鋳型に流し込み架橋することで、酸素生成マイクロウェルを作製した。ヒト肝がん細胞株 HepG2 を酸素生成マイクロウェル中で 3 日間培養した結果、過酸化カルシウムの混合量の増加に伴い、形成された細胞スフェロイドのサイズが増大した。また、Live/Dead 染色により内部の細胞生存率を評価した結果、酸素生成マイクロウェルを用いて作製した細胞スフェロイドでは、従来のマイクロウェルを用いて作製した細胞スフェロイドと比較して内部の細胞生存率が向上した。HepG2 スフェロイド培養環境中の酸素濃度を溶存酸素計により測定した結果、酸素生成マイクロウェルを用いた群では、過酸化カルシウムの混合量に応じて培養環境中の酸素濃度が上昇した。最後に、酸素生成マイクロウェルの汎用性を確かめるために、マウスインスリノーマ細胞株 MIN6、マウスメラノーマ細胞株 B16-BL6、マウス間葉系幹細胞 ASC を用いて同様に細胞スフェロイドを作製した。その結果、いずれの細胞においても、酸素生成マイクロウェルを用いて細胞スフェロイドを作製することで、細胞生存率に優れた細胞スフェロイドを得ることに成功した。

以上より、細胞スフェロイド培養環境に持続的に酸素を発生する過酸化カルシウムを含有した PDMS 製の酸素生成マイクロウェルの開発に成功し、酸素生成マイクロウェルを用いて細胞スフェロイドを作製することで、培養環境中の酸素濃度の低下が緩和し、細胞スフェロイド中の細胞生存率が向上することを明らかにした。

第二節 ゼラチン微粒子内包細胞スフェロイドの開発

細胞構造体に種々の生体材料を組み合わせることで、細胞の生存率および機能を向上できることが報告されている^{43,44}。ゼラチンは、細胞の接着が可能であり、生体適合性に優れ、加工が容易であることから、細胞構造体中に組み入れることが可能な生体材料である⁴⁵。さらにゼラチンハイドロゲルを微粒子に加工したゼラチン微粒子 (gelatin microsphere: GMS) は網目構造を持つことから、微粒子内部を酸素が透過可能である^{46,47}。以上より、GMS を酸素の透過経路として細胞スフェロイド中に内包することで、細胞スフェロイド内部の酸素透過性を向上し、低酸素環境を改善するとともに、細胞機能および細胞生存率に優れた細胞スフェロイドが開発可能と考えた。

そこで第二章第二節では、W/O エマルション法により作製した GMS の HepG2 スフェロイドへの内包および GMS の内包による HepG2 スフェロイド中の低酸素環境の改善効果、および細胞生存率、細胞機能を評価した。W/O エマルション法により多孔性構造を有する、粒子径 10~100 μm の GMS を作製した。GMS とヒト肝がん細胞株 HepG2 を混合し、マイクロウェル中で 3 日間培養したところ、GMS の混合量に応じて細胞スフェロイドのサイズが増大した。また、蛍光標識 GMS を用いた検討から、細胞スフェロイド中に GMS が内包されていることを確認した。細胞中の低酸素環境下において蛍光活性を有する低酸素応答性プローブ MAR を用いて、細胞スフェロイド内部の酸素環境を評価した結果、GMS の内包量に応じて蛍光活性が低下したことから、GMS の内包により細胞スフェロイド内部の低酸素環境が緩和していることが示された。また、Live/Dead 染色により細胞スフェロイド内部の細胞生存率を評価した結果、従来の細胞スフェロイドと比較して GMS を内包した細胞スフェロイドでは、細胞スフェロイド中の細胞生存率が向上した。最後に、Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) アッセイにより CYP1A1 活性を評価した結果、GMS の内包により細胞スフェロイド中の HepG2 細胞の CYP1A1 活性は増大した。

以上より、HepG2 と GMS を混合しマイクロウェル中で培養することで GMS 内包 HepG2 スフェロイドの開発に成功し、作製した HepG2/GMS スフェロイド中では低酸素環境が緩和され、細胞生存率および HepG2 の CYP1A1 活性が向上することを明らかにした。

第三章 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 微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

間葉系幹細胞 (MSC) は免疫調節能をもつこと、組織修復に関与する成長因子の産生能が高いことから、創傷治療への応用が期待されている⁴⁸。しかしながら、アポトーシス誘導因子や酸化ストレスにさらされる厳しい創傷微小環境下への MSC の移植は生着率および機能の低下を引き起こす。そのため、MSC の創傷治療効果を高めるための工夫が必要となる⁴⁹。これまでに、MSC の細胞スフェロイド化や薬剤による前処理が、成長因子の産生量の増加や抗アポトーシス耐性の誘導を亢進することで、移植後の創傷治療効果を向上することが報告されている⁵⁰⁻⁵⁵。また、塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) は、創傷部位において増加し、肉芽組織の形成や上皮組織の修復、組織のリモデリングに関与する成長因子の一つである。また、bFGF が MSC を活性化することで、細胞増殖および抗アポトーシス耐性が向上することも報告されている^{56,57}。さらに、心筋細胞移植においては移植と同時に投与することで、心筋細胞の生着率が向上することが報告されている⁵⁸。以上のことから、MSC スフェロイドと bFGF を組み合わせることで、強力な創傷治療促進システムを構築可能であると考えた。しかしながら、MSC スフェロイドに効率的に bFGF を作用させるためには、密な細胞スフェロイド内部に bFGF を効率的に作用させることと、移植前後において MSC スフェロイドに bFGF を作用させることが必要である。第二章第二節では、GMS を内包した細胞スフェロイドの作製に成功し、これが細胞スフェロイド中の細胞生存率を向上することを明らかにした。そこで、細胞スフェロイドに内包する GMS に bFGF を搭載し、bFGF を徐放化することで上記問題を解決可能であると考えた。

移植前後にわたる長期的な MSC の活性化には、十分量の bFGF 量の搭載と長期間の徐放システムが必要である。しかしながら、GMS の一般的な調製法である W/O エマルション法では、GMS 作製過程に高温処理、有機溶媒の使用、アミノ基の架橋反応等のタンパク質の失活過程を含むことから、bFGF の搭載は粒子形成後の GMS 表面への静電的相互作用を利用したポストローディングに限られ、搭載効率および GMS からの徐放性が問題であった。そのため、bFGF 搭載 GMS を内包した MSC スフェロイドの開発のためには、搭載効率と徐放性に優れた bFGF 搭載 GMS の作製法を開発する必要がある。bFGF を粒子形成と同時に搭載するプレローディング法では、GMS 内部に bFGF が搭載されることで、搭載効率と徐放性が改善すると考えられる。そのため、タンパク質失活過程を含まない GMS の作製法を開発し、bFGF を GMS にプレローディングすることで、搭載効率と徐放性に優れた bFGF 搭載 GMS が作製可能であると考えた。

水性二相分離法 (w/w 法) は、高濃度に水に溶解した 2 種のポリマーが 2 相に分離する現象である⁵⁹。w/w 法を利用することで、有機溶媒を用いずにゼラチン溶液の乳化が可能と考

えられる。また、ゼラチンのアミノ基をメタクリル酸修飾したメタクリル酸修飾ゼラチン (gelatin methacrylate: GMA) は、修飾によりゼラチンの2次構造が壊れるためゲル化温度が低く、また紫外線照射によるメタクリル基間の化学的架橋によりゲル化が可能である⁶⁰。そのため、GMAを用いることで、低温条件下で化学架橋剤を用いることなくGMSのゲル化および安定化が可能と考えられる。

そこで第三章では、w/w法とGMAを応用し、高濃度ポリエチレングリコール(PEG)水溶液中にbFGFとGMAを混合した水溶液を乳濁し、紫外線照射により架橋することで、bFGFをプレローディング可能な、bFGF搭載メタクリル酸修飾ゼラチン微粒子(bFGF-w/w mGMS)を開発するとともに、bFGF-w/w mGMSを内包した脂肪由来間葉系幹細胞(ASC)スフェロイドの開発と創傷治療効果の評価を試みた。w/w法によりGMA溶液を高濃度PEG溶液に乳濁し、紫外線を照射することで粒子径が約10 μ m程度のw/w mGMAを得た。蛍光標識bFGFをw/w mGMS作製時に混合した際に得られた粒子中に蛍光標識bFGF由来の蛍光が観察されたことから、bFGFがw/w mGMSにプレローディングされたことが示された。また、従来のw/o GMSにbFGFをポストローディングした場合と比較して、w/w mGMSにbFGFをポストローディングした際には、搭載効率が向上するとともに、GMSからの放出が遅延した。さらに、ASC細胞株の増殖活性を指標に生物活性を評価した結果、w/w mGMSに内包されたbFGFは、フリーのbFGF、w/o GMSにポストローディングされたbFGFと比較して、高い生物活性を示した。続いて、bFGF-w/w mGMSを内包したASCスフェロイドを作製した。bFGF-w/w mGMSを内包したASCスフェロイドでは、従来のASCスフェロイドと比較して、細胞スフェロイドあたりのDNA量が増加したことから、細胞増殖活性が向上していることが示された。また、Live/Dead染色により内部の細胞生存率を評価した結果、従来のASCスフェロイドでは内部にほとんど生細胞由来の緑色蛍光が検出されない一方で、bFGF-w/w mGMS内包ASCスフェロイドでは、細胞スフェロイド全体に生細胞由来の緑色蛍光が認められたことから、bFGF-w/w mGMSの内包により細胞スフェロイド内の細胞生存率が向上していることが示された。創傷治療因子であるVEGF、HGF、TGF- β 1のmRNA発現量をRT-PCR法により評価した結果、bFGF-w/w mGMS内包ASCスフェロイドでは、従来のASCスフェロイドと比較して、いずれのmRNA発現量も増大した。最後に、創傷モデルマウスに移植した際の創傷治療効果を評価した結果、bFGF-w/w mGMS内包ASCスフェロイドを移植した群では、従来のASCスフェロイドを移植した群と比較して創傷サイズが早期に縮小する傾向が見られた。

以上より、水性二相分離法とGMAを応用することで、新たにbFGFのプレローディング可能なw/w mGMS作製法を開発した。また、開発したbFGF-w/w mGMSは従来のbFGF-w/o GMSと比較してbFGFの搭載効率および徐放性に優れることを明らかにするとともに、ASCスフェロイドに内包することで、ASCの創傷治療効果を向上させることに成功した。

結論

著者は三章にわたり、高機能細胞スフェロイド開発を目的とした細胞スフェロイド微小環境制御について検討し、以下の結論を得た。

第一章 混合細胞スフェロイド中の細胞局在に影響を及ぼす因子の解明および細胞局在の制御

NIH3T3/MIN6 スフェロイドが示すコアシェル型の細胞局在が、おもに NIH3T3 の FAK シグナルを介した指向性のある細胞遊走により形成されることを見出した。NIH3T3 のシェル領域への遊走誘導を目的に collagen I をコーティングしたマイクロウェルを用いて NIH3T3 のコア領域への細胞遊走が阻害することで、ランダム型の細胞配置を示す NIH3T3/MIN6 スフェロイドを得ることに成功し、内部の細胞配置を制御できる可能性を示した。

第二章第一節 酸素生成マイクロウェルの開発

PDMS に過酸化カルシウムを混合し固化することにより、混合量に応じて酸素を持続的に放出する PDMS 基板を作製し、これをマイクロウェルに加工することで酸素生成マイクロウェルを開発した。この酸素生成マイクロウェルを使用することで、培地中の酸素濃度の低下が抑制ならびに細胞スフェロイド中の低酸素環境の緩和に成功し、酸素生成マイクロウェルが細胞生存率に優れた細胞スフェロイドの作製に有用であることを示した。

第二章第二節 ゼラチン微粒子内包細胞スフェロイドの開発

w/o エマルション法により作製した多孔性の GMS を、HepG2 スフェロイドに内包することで、HepG2 スフェロイドの低酸素環境および細胞生存率を改善した。また、GMS の内包により細胞スフェロイド中 HepG2 の CYP1A1 活性上昇を明らかにした。以上より、GMS 内包細胞スフェロイドが、細胞生存率および細胞機能に優れた細胞スフェロイドの開発に有用である可能性を見出した。

第三章 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微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

高濃度 PEG 溶液中に GMA 溶液を分散し、紫外線により架橋することで、従来の w/o GMS

と比較して粒子の均一性、安定性、bFGF の搭載効率および徐放性に優れる w/w mGMS の開発に成功した。また、bFGF 搭載 w/w mGMS を ASC スフェロイドに内包することで、細胞の生存率および創傷治療因子の mRNA 発現量が向上すること、創傷モデルマウスの皮下移植後の治療効果が向上することを明らかにした。

以上、著者は、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、細胞配置の制御、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する。

謝辞

終わりに臨み、本研究に際して、終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました京都大学大学院薬学研究科 高倉喜信教授に衷心より深甚なる謝意を表します。

また、終始御懇篤なる御助言と御指導を賜りました東京理科大学薬学部 西川元也教授、京都大学大学院薬学研究科 高橋有己准教授に謹んで深く感謝の意を表します。

実験の一部に御協力、御助言、御指導を賜りました立命館大学理工学部 小西 聡教授、名古屋大学大学院工学研究科 清水一憲准教授、東京理科大学薬学部 草森浩助教に心からの感謝の意を表します。

さらに、種々の貴重な御助言を賜りました京都大学大学院薬学研究科病態情報薬学分野教室一同、特に実験の一部に御協力戴いた守谷愛衣学士、山口拓真様、塩野光希様に深謝します。

実験の部

第一章 実験の部

【1】 試薬

ダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM) と RPMI 1640 培地は日水製薬株式会社より購入した。高濃度グルコース含有 DMEM と focal adhesion kinase (FAK) inhibitor 14 は、Sigma-Aldrich 社から購入した。Medium 199 と fetal bovine serum と 5-(and-6)-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) と 1,1'-dioctadecyl-3-3'-3'-tetramethylindocarbocyanine (DiI) と Opti-MEM は Thermo Fisher Scientific 社より購入した。Polydimethylsiloxane polymer (Silpot 184) と硬化用触媒 (CATALYST SILPOT 184) は東レダウコーニング社より購入した。Cytochalasin D と Y-27632 は和光純薬株式会社より購入した。百日咳毒素は List Biological Laboratories 社より購入した。Janus kinase (JAK) inhibitor 1 は Merck 社より購入した。Collagen type I (rat tail) は BD Bioscience 社より購入した。Poly(N-isopropylacrylamide) (PNIPAAm) は Scientific Polymer Products 社より購入した。他の試薬は市販の特級品を用いた。

【2】 細胞株

マウスインスリノーマ株 MIN6 は大阪大学大学院医学系研究科幹細胞制御学分野宮崎純一教授より供与していただいた。MIN6 は非働化した 10 v/v% FBS、0.3 w/v% 炭酸水素ナトリウム、0.5 mM monothioglycerol、100 units/mL penicillin、100 µg/mL streptomycin を添加した 4.5 g/L の glucose と l-glutamine を含む高濃度グルコース含有 DMEM 培地で培養した。マウス線維芽細胞株 NIH3T3、マウス筋芽細胞株 C2C12、マウス線維芽細胞株 3T3L1、ヒト肝がん由来細胞株 HepG2 は ATCC 社より購入した。NIH3T3、C2C12、3T3L1、HepG2 は 10 v/v% FBS、0.2 w/v% 炭酸水素ナトリウム、100 units/mL penicillin、100 µg/mL streptomycin、293 µg/mL l-glutamine (PSG) を添加した DMEM で培養した。マウス結腸がん細胞株 colon26 は、公益財団法人がん研究会より供与していただいた。Colon26 は、10 v/v% FBS、0.2 w/v% 炭酸水素ナトリウム、PSG を添加した RPMI 1640 培地で培養した。マウス大動脈血管内皮細胞株 MAEC は鶴見大学歯学部口腔病理学部齋藤一郎先生より供与していただいた。MAEC は 10 v/v% FBS、0.3 w/v% 炭酸水素ナトリウム、PSG を添加した Medium 199 で培養した。すべての細胞は 37 °C、5 % CO₂、加湿条件下で培養した。

【3】 PDMS 製マイクロウェルの作製

マイクロウェル基板は過去の報告に従って作製した³⁵。直径と高さが均一に 400 µm に設

計されたドーム状の突起が整列したプラスチック樹脂製の鋳型を、3-dimensional printing system を用いて作製した。PDMS と硬化用触媒を 10:1 の比で混合した PDMS 混合液上に鋳型を置き、60 °C、2 時間以上静置することで硬化させた。得られた PDMS 製マイクロウェル基板から、鋳型を剥離し直径約 35 mm の円形になるように整形した。得られたマイクロウェルの高さ、中間直径、最大直径はそれぞれ、 $310 \pm 5 \mu\text{m}$ 、 $310 \pm 3 \mu\text{m}$ 、 $432 \pm 20 \mu\text{m}$ であった。得られたマイクロウェル基板は、6 ウェルプレートに設置後、エタノールに溶解した 1 w/v% PNIPAAm をマイクロウェル基盤上に 2 mL 添加し、過剰な液を回収後、60 °C、1 時間以上乾燥させることで、表面コーティングを施した。また、collagen I コーティングマイクロウェルは、6 ウェルプレートに設置後、50 $\mu\text{g/mL}$ collagen type I を溶解した 0.02 M 酢酸を 3 mL 添加し、一夜インキュベートしたのちに、上清を除いたあと PNIPAAm コーティングを施して作製した。

【4】混合細胞スフェロイドの作製

単層培養した細胞を 0.25 w/v% trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 溶液を用いて回収した。回収した異なる細胞を 1:1 の割合で混合し、計 5.0×10^6 cells/3 mL で培地に調製した。続いて、マイクロウェル基板を設置した 6 ウェルプレートに、調製した細胞懸濁液を 3 mL 播種し、 5.0×10^6 cells/well で 72 時間、37 °C、5% CO₂、加湿条件下で培養した。なお、細胞の培養培地が異なる場合は、それぞれの細胞に適した培地を 1:1 で混合した培地を混合細胞スフェロイド培養培地として用いた。NIH3T3/MIN6 スフェロイドにおいては、0.25 w/v% trypsin-EDTA 溶液により細胞スフェロイドを破壊し、細胞計数を行うことで細胞スフェロイドあたりの細胞数を算出した。また、DiI 標識した NIH3T3 と CFSE 標識した MIN6 で NIH3T3/MIN6 スフェロイドを作製し、trypsin-EDTA による破壊後にフローサイトメトリー (Gallios; Beckman Coulter 社) を用いて NIH3T3/MIN6 スフェロイド中の細胞比を測定した。

【5】混合細胞スフェロイド中の細胞配置の評価

単層培養中の細胞を 10 μM の CFSE、または 1 μM の DiI を溶解した Opti-MEM で、37 °C、5% CO₂、加湿条件のもと、30 分処理することで蛍光標識を行った。蛍光標識した細胞を用いて作製した混合細胞スフェロイドを共焦点レーザー顕微鏡 (Nikon A1R MP) により観察した。また、三次元解析においては、作製した混合細胞スフェロイドを過去の報告をもとに一部改変した方法で透明化処理を行った⁸⁶。マイクロウェル中に作製した細胞スフェロイドをリン酸緩衝液 (PBS; 137 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM NaH₂PO₄) により 3 回洗浄後、20-25 °C 条件下で 4% パラホルムアルデヒド含有リン酸緩衝液 (ナカライテスク社) を用いて 15 分間固定処理した。その後、PBS で 3 回洗浄を行い、ScaleSQ(0) (22.5 w/v% D-[-]-sorbitol, 9.1 M 尿素、pH 8.4) で 2 時間、続いて ScaleS4(0) (40 w/v% D-[-]-sorbitol, 10 w/v% glycerol, 4 M 尿素、20 v/v% dimethyl sulfoxide) で 2 時間処理するこ

とで透明化処理を行った。透明化したサンプルは共焦点レーザー顕微鏡により観察した。

【6】細胞遊走阻害薬の処理

蛍光標識した NIH3T3 と MIN6 をマイクロウェルに播種し、1 時間後に遊走阻害薬を含む培地に交換した。遊走阻害薬はそれぞれ以下の通りである。0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ cytochalasin D、10 μM Y-27632、10 ng/mL 百日咳毒素、5 μM JAK inhibitor I、10 μM FAK inhibitor 14。また、cytochalasin D と Y-27632 で処理した場合には、培養プレートから細胞を回収する 12 時間前より同阻害薬にて処理した。マイクロウェル中で 24 時間の培養後、共焦点レーザー顕微鏡により観察した。また、FAK inhibitor 14 の前処理は、培養プレートから細胞を回収する 24 時間前より 10 μM FAK inhibitor 14 を溶解した培地で培養することで行った。

【7】qRT-PCR 法

Seasol RNA-I Super G を用いて、800 個の細胞スフェロイドより RNA を抽出した。得られた RNA より ReverTra Ace qPCR RT Kit を用いて cDNA を逆転写した。mRNA の定量的解析には、StepOnePlus™ を用いてリアルタイム-PCR 法により行った。標的遺伝子の mRNA 発現に対する相対定量時の標準として、 β -actin を用いた。用いたプライマーは以下の通りである。*Integrin α 1*: forward (5'-ATGGAGCCACCGATCCACA-3')、reverse (5'-ACGTACACCTTGCCCTGTTC-3')。 *Integrin α 2*: forward (5'-CATGTGAGGTTGGTTCATCG-3')、reverse (5'-TCGTGAGACTGACCGAATTG-3')。 *Integrin α 10*: forward (5'-GCAGCAAGGAACCTAAGTCG-3')、reverse (5'-TCTCCATCATGGGACTCTCC-3')。 *Integrin α 11*: forward (5'-AGATGTCGCAGACTGGCTTT-3')、reverse (5'-CCCTAGGTATGCTGCATGGT-3')。 *Integrin β 1*: forward (5'-GCAACGCATATCTGGAAACTTG-3')、reverse (5'-CAAAGTGAAACCCAGCATCC-3')。 *β -actin*: forward (5'-CATCCGTAAAGACCTCTAGCCAAC-3')、reverse (5'-ATGGAGCCACCGATCCACA-3')。

【8】細胞遊走アッセイ

細胞遊走アッセイには、ポアサイズが 8 μm の 24 ウェルプレートサイズのトランズウェルを用いた。50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の collagen I を溶かした 0.02 M 酢酸溶液に 4 $^{\circ}\text{C}$ で一夜浮かすことで、アッパーチャンバーの底側にコーティングを行った。ボトムチャンバーに 650 μL の DMEM を、アッパーチャンバーに CFSE 標識した NIH3T3 と MIN6 をそれぞれ $1.0 \times 10^5/100 \mu\text{L}$ 添加した。6 時間後、ボトムチャンバーを PBS で洗浄し、350 μL の 0.25 w/v% trypsin-EDTA 溶液で 1 時間処理して得られた細胞懸濁液の蛍光強度を、マルチラベルカウンター (Wallac 1420 ARVO MX) を用いて測定した。

【9】 Visual scoring

過去の報告例に従い、NIH3T3/MIN6 スフェロイド中の細胞配置を定量的に評価した。NIH3T3/MIN6 スフェロイドの細胞配置を以下の5つの分類に分けた (Fig. 1C)。(I) NIH3T3のコア領域が75-100% MIN6に覆われている。(II) NIH3T3のコア領域が50-75% MIN6に覆われている。(III) MIN6のコア領域が50-75% NIH3T3に覆われている。(IV) MIN6のコア領域が75-100% NIH3T3に覆われている。(V) 二つの細胞からなる領域を明確に内外に分類できない。1つの群当たり100枚のNIH3T3/MIN6 スフェロイドの共焦点レーザー顕微鏡写真を評価した。

【10】 統計学的解析

有意差検定は、スチューデントのt検定を用いた。また、 $p < 0.05$ を統計学的に有意とした。

引用文献

1. Takahashi K, Yamanaka S: Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. **126** 663-76 (2006)
2. Kinbrel EA, Lanza R: Current status of pluripotent stem cells: moving the first therapies to the clinic. *Nat Rev Drug Discov*. **16** 115-130 (2015)
3. Barker RA, Parmar M, Studer L, Takahashi J: Human Trials of Stem Cell-Derived Dopamine Neurons for Parkinson's Disease: Dawn of New Era. *Cell Stem Cell*. **21** 569-573 (2017)
4. Shi Y, Inoue H, Wu JC, Yamanaka S: Induced pluripotent stem cell technology: a decade of progress. *Nat Rev Drug Discov*. **16** 115-130 (2017)
5. Ong CS, Zhou X, Han J, Huang CY, Nashed A, Khatri S, Mattson G, Fukunishi T, Zhang H, Hibino N: *In vivo* therapeutic applications of cell spheroids. *Biotechnol Adv* **36** 494-505 (2018)
6. Sant S, Johnston PA: The production of 3D tumor spheroids for cancer drug discovery. *Drug Discov Today Technol*. **23** 27-36 (2017)
7. Underhill GH, Khetani SR: Bioengineered liver models for drug testing and cell differentiation studies. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. **5** 426-439 (2017)
8. Khawar IA, Park JK, Jung ES, Lee MA, Chang S, Kuh HJ: Three dimensional mixed-cell spheroids mimic stroma-mediated chemoresistance and invasive migration in hepatocellular carcinoma: *Neoplasia*. **20** 800-812 (2018)
9. Long L, Yin M, Min W: 3D Co-culture system of tumor-associated macrophages and ovarian cancer cells: *Bio Protoc*. **8** (2018)
10. Kusamori K, Nishikawa M, Mizuno N, Nishikawa T, Masuzawa A, Tanaka Y, Mizukami Y, Shimizu K, Konishi S, Takahashi Y, Takakura Y: Increased insulin secretion from insulin-secreting cells by construction of mixed multicellular spheroids: *Pharm Res*. **33** 247-56 (2016)
11. Scudellari M: How iPS cells changed the world. *Nature*. **534** 310-2 (2016)
12. Shao Y, Sang J, Fu J: On human pluripotent stem cell control: The rise of 3D bioengineering and mechanobiology. *Biomaterials*. **52** 26-43 (2015)
13. Sasai Y: Next-generation regenerative medicine: organogenesis from stem cells in 3D culture. *Cell Stem Cell*. **12** 520-30 (2013)
14. Drost J, Clevers H: Translational applications of adult stem cell-derived organoids. *Development*. **144** 968-975 (2017)

15. Cui X, Hartanto Y, Zhang H. Advances in multicellular spheroids formation. *J R Soc Interface*. **14** (2017)
16. Fennema E, Rivron N, Rouwkema J, van Blitterswijk C, de Boer J: Spheroid culture as a tool for creating 3D complex tissues. *Trends Biotechnol*, **31** 108-15 (2013)
17. Bhang SH, Lee S, Shin JY, Lee TJ, Kim BS: Transplantation of cord blood mesenchymal stem cells as spheroids enhances vascularization. *Tissue Eng A*, **18** 2138-47 (2012)
18. Yap KK, Dingle AM, Palmer JA, Dhillon RS, Lokmic Z, Penington AJ, Yeoh GC, Morrison WA, Mitchell GM: Enhanced liver progenitor cell survival and differentiation in vivo by spheroid implantation in a vascularized tissue engineering chamber. *Biomaterials*. **34** 3992-4001 (2013)
19. 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*. **173** 119-24
20. Rebelo SP, Costa R, Silva MM, Marcelino P, Brito C, Alves PM: Three-dimensional co-culture of human hepatocytes and mesenchymal stem cells: improved functionality in long-term bioreactor cultures. *J Tissue Eng Regen Med*. **11** 2034-2045 (2017)
21. Dolensek J, Rupnik MS, Stozer A: Structural similarities and differences between the human and the mouse pancreas. *Islets*. **7** (2015)
22. Devreotes P, Horwitz AR: Signaling networks that regulate cell migration. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. **7** a005959 (2015)
23. Hytönen VP, Wehrle-Haller B. Mechanosensing in cell-matrix adhesions - Converting tension into chemical signals. *Exp Cell Res*. **343** 35-41 (2016)
24. Arous C, Wehrle-Haller B: Role and impact of the extracellular matrix on integrin-mediated pancreatic β -cell functions. *Biol Cell*. **109** 223-237 (2017)
25. Hansen NU, Genovese F, Leeming DJ, Karsdal MA: The importance of extracellular matrix for cell function and in vivo likeness. *Exp Mol Pathol*. **98** 286-94 (2015)
26. Murphy AR, Laslett A, O'Brien CM, Cameron NR: Scaffolds for 3D in vitro culture of neural lineage cells. *Acta biomater*. **54** 1-20 (2017)
27. Masuda S, Shimizu T: Three-dimensional cardiac tissue fabrication based on cell sheet technology. *Adv Drug Deliv Rev*. **96** 103-9 (2016)
28. Hong N, Yang GH, Lee J, Kim G. 3D bioprinting and its *in vivo* applications. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. **106** 444-459 (2018)
29. Hsu SH, Ho TT, Huang NC, Yao CL, Peng LH, Dai NT: Substrate-dependent modulation of 3D spheroid morphology self-assembled in mesenchymal stem cell-endothelial progenitor cell coculture. *Biomaterials*. **35** 7295-307 (2014)
30. Lin RZ, Chou LF, Chien CC, Chang HY. Dynamic analysis of hepatoma spheroid formation:

- roles of E-cadherin and beta1-integrin. *Cell Tissue Res.* **324** 411-22 (2006)
31. Robinson EE, Zazzali KM, Corbett SA, Foty RA: Alpha5beta1 integrin mediates strong tissue cohesion. *J Cell Sci.* **116** 377-86
 32. Haeger A, Wolf K, Zegers MM, Friedl P: Collective cell migration: guidance principles and hierarchies. *Trends Cell Biol.* **25** 556-66 (2015)
 33. Shapiro AM, Pokrywczynska M, Ricordi C: Clinical pancreatic islet transplantation. *Nat Rev Endocrinol.* **13** 268-277 (2017)
 34. Wong SF, No da Y, Choi YY, Kim DS, Chung BG, Lee SH: Concave microwell based size-controllable hepatosphere as a three-dimensional liver tissue model. *Biomaterials.* **32** 8087-8096 (2011)
 35. 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.* **115** 695-9 (2013)
 36. Nishikawa T, Tanaka Y, Nishikawa M, Ogino Y, Kusamori K, Mizuno N, Mizukami Y, Shimizu K, Konishi S, Takahashi Y, Takakura Y: Optimization of albumin secretion and metabolic activity of cytochrome P450 1A1 of human hepatoblastoma HepG2 cells in multicellular spheroids by controlling spheroid size. *Biol Pharm Bull.* **40** 334-338 (2017)
 37. Tanaka Y, Nishikawa M, Mizukami Y, Kusamori K, Ogino Y, Nishimura S, Shimizu K, Konishi S, Takahashi Y, Takakura Y: Control of polarization and tumoricidal activity of macrophages by multicellular spheroid formation. *J Control Release.* **270** 177-183 (2018)
 38. Riffle S, Pandey RN, Albert M, Hegde RS. Linking hypoxia, DNA damage and proliferation in multicellular tumor spheroids. *BMC Cancer* **17** 338 (2017)
 39. Grimes DR, Kelly C, Bloch K, Partridge M: A method for estimating the oxygen consumption rate in multicellular tumour spheroids. *J R Soc Interface.* **11** (2014)
 40. Pedraza E, Coronel MM, Fraker CA, Ricordi C, Stabler CL: Preventing hypoxia-induced cell death in beta cells and islets via hydrolytically activated, oxygen-generating biomaterials. *Proc Natl Acad Sci USA.* **109** 4245-50 (2012)
 41. Coronel MM, Geusz R, Stabler CL. Mitigating hypoxic stress on pancreatic islets via in situ oxygen generating biomaterial. *Biomaterials.* **129** 139-151 (2017)
 42. Coronel MM, Liang JP, Li Y, Stabler CL: Oxygen generating biomaterial improves the function and efficacy of beta cells within a microencapsulation device. *Biomaterials.* **210** 1-11 (2019)
 43. Oliveira MB, Mano JF. Polymer-based microparticles in tissue engineering and regenerative medicine. *Biotechnol Prog.* **27** 897-912 (2011)
 44. Ahrens CC, Dong Z, Li W: Engineering cell aggregates through incorporated polymeric microparticles. *Acta Biomater.* **62** 64-81 (2017)
 45. Echave MC, Saenz del Burgo L, Pedraz JL, Orive G: Gelatin as biomaterial for tissue

- engineering. *Curr Pharm Des.* **23** 3567-3584 (2017)
46. Hong L, Miyamoto S, Hashimoto N, Tabata Y: Synergistic effect of gelatin microspheres incorporating TGF-beta1 and a physical barrier for fibrous tissue infiltration on skull bone formation. *J Biomater Sci Polym Ed.* **11** 1357-69 (2000)
 47. Patel ZS, Yamamoto M, Ueda H, Tabata Y, Mikos AG: Biodegradable gelatin microparticles as delivery systems for the controlled release of bone morphogenetic protein-2. *Acta Biomater.* **4** 1126-38 (2008)
 48. Lee DE, Ayoub N, Agrawal DK: Mesenchymal stem cells and cutaneous wound healing: novel methods to increase cell delivery and therapeutic efficacy. *Stem Cell Res Ther.* **7** (2016)
 49. Shojaei F, Rahmati S, Banitalebi Dehkordi M. A review on different methods to increase the efficiency of mesenchymal stem cell-based wound therapy. *Wound Repair Regen.* **27** 661-671 (2019)
 50. Hsu SH, Heieh PS. Self-assembled adult adipose-derived stem cell spheroids combined with biomaterials promote wound healing in a rat skin repair model. *Wound Repair Regen.* **23** 57-64 (2015)
 51. Santos JM, Camões SP, Filipe E, Cipriano M, Barcia RN, Filipe M, Teixeira M, Simões S, Gaspar M, Mosqueira D, Nascimento DS, Pinto-do-Ó P, Cruz P, Cruz H, Castro M, Miranda JP: Three-dimensional spheroid cell culture of umbilical cord tissue-derived mesenchymal stromal cells leads to enhanced paracrine induction of wound healing. *Stem Cell Res Ther.* **6** (2015)
 52. Murphy KC, Whitehead J, Zhou D, Ho SS, Leach JK: Engineering fibrin hydrogels to promote the wound healing potential of mesenchymal stem cell spheroids. *Acta Biomater.* **64** 176-86 (2015)
 53. Ghosh D, McGrail DJ, Dawson MR: TGF- β 1 pretreatment improves the function of mesenchymal stem cells in the wound bed. *Front Cell Dev Biol.* **5** (2017)
 54. Fan Y, Wang L, Liu C, Zhu H, Zhou L, Wang Y, Wu X, Li Q: Local renin-angiotensin system regulates hypoxia-induced vascular endothelial growth factor synthesis in mesenchymal stem cells. *Int J Clin Exp Pathol.* **8** 2505-14 (2015)
 55. Shen L, Zeng W, Wu YX, Hou CL, Chen W, Yang MC, Li L, Zhang YF, Zhu CH: Neurotrophin-3 accelerates wound healing in diabetic mice by promoting a paracrine response in mesenchymal stem cells. *Cell Transplant.* **22** 1011-21 (2013)
 56. Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M: Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen.* **16** 585-601 (2008)
 57. Nawrocka D, Kornicka K, Szydlarska J, Marycz K: Basic fibroblast growth factor inhibits apoptosis and promotes proliferation of adipose-derived mesenchymal stromal cells isolated from patients with type 2 diabetes by reducing cellular oxidative stress. *Oxid Med Cell Longev.* **2017** 3027109 (2017)

58. Matsuo T, Masumoto H, Tajima S, Ikuno T, Katayama S, Minakata K, Ikeda T, Yamamizu K, Tabata Y, Sakata R, Yamashita JK: Efficient long-term survival of cell grafts after myocardial infarction with thick viable cardiac tissue entirely from pluripotent stem cells. *Sci Rep.* **5** 16842 (2015)
59. Jordi Esquena: Water-in-water (W/W) emulsions. *Curr Opin Colloid Interface S.* **25** 109-119 (2016)
60. Yue K, Trujillo-de Santiago G, Alvarez MM, Tamayol A, Annabi N, Khademhosseini A: Synthesis, properties, and biomedical applications of gelatin methacryloyl (GelMA) hydrogels. *Biomaterials.* **73** 254-71 (2015)