

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

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
2.1.1 過酸化カルシウムを内包した PDMS からの酸素生成	
2.1.2 酸素生成マイクロウェルの作製	
2.1.3 酸素生成マイクロウェルを用いた HepG2 スフェロイドの作製	
2.1.4 酸素生成マイクロウェルの低酸素環境改善効果の評価	
2.1.5 酸素生成マイクロウェルの汎用性評価	
2.1.6 考察	
第二節 ゼラチン微粒子内包細胞スフェロイドの開発	24
2.2.1 GMS の作製	
2.2.2 GMS 内包 HepG2 スフェロイドの作製	
2.2.3 GMS の内包による HepG2 スフェロイド内低酸素環境改善効果の評価	
2.2.4 HepG2/GMS スフェロイド中の細胞生存率の評価	
2.2.5 HepG2/GMS スフェロイドの CYP1A1 活性評価	
2.2.6 考察	
第三章 塩基性線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	30
3.1. GMA の合成	

3.2.	w/w-mGMS の作製	
3.3.	w/w mGMS と w/o GMS の物性評価	
3.4.	w/w mGMS と w/o GMS の安定性の比較	
3.5.	w/w mGMS への bFGF プレローディング	
3.6.	bFGF の w/w mGMS と w/o GMS への搭載効率の比較	
3.7.	bFGF の w/w mGMS と w/o GMS からの徐放性の比較	
3.8.	w/w mGMS と w/o GMS に搭載した bFGF の生物活性の比較	
3.9.	bFGF-w/w mGMS の ASC スフェロイドへの内包	
3.10.	bFGF-w/w mGMS の内包による ASC スフェロイド中の細胞生存率の評価	
3.11.	bFGF-w/w mGMS の内包による ASC スフェロイドの創傷治療因子発現量評価	
3.12.	bFGF-w/w mGMS を内包した ASC スフェロイドの創傷治療効果の評価	
3.13.	考察	
結論	-----	45
謝辞	-----	47
実験の部		
第一章	実験の部 -----	48
第二章第一節	実験の部-----	51
第二章第二節	実験の部-----	53
第三章	実験の部 -----	55
引用文献	-----	60

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ことで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）。Figure 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）。

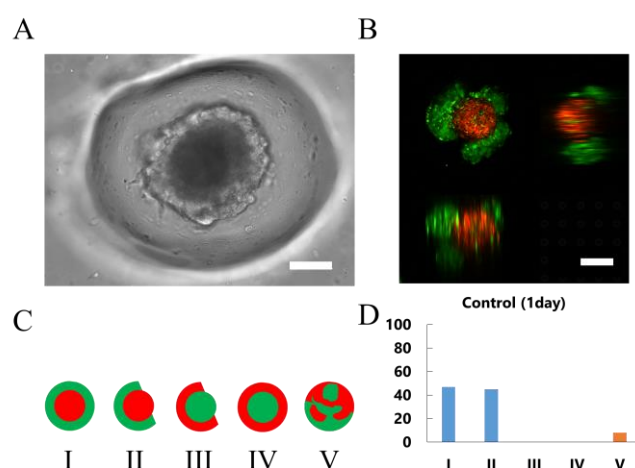


Figure 1. Core-shell-type distribution of MIN6 and NIH3T3 cells in mixed multicellular spheroids. (A) An image of a NIH3T3/MIN6 spheroid in a microwell after 72 h of incubation. Scale bar = 100 μ m. (B) Three-dimensional fluorescence images of a NIH3T3/MIN6 spheroid after optical clearing. Top left, 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。

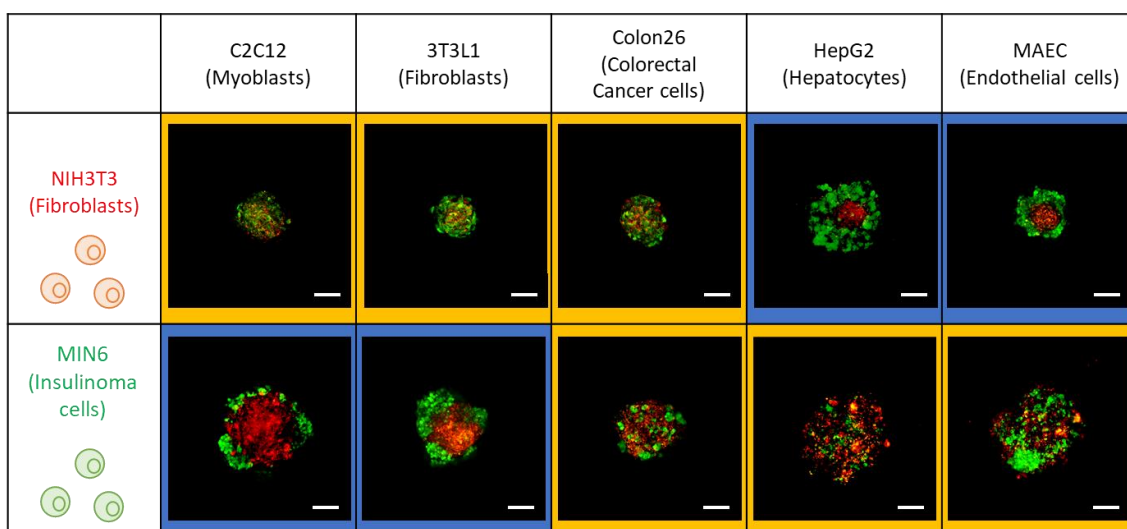


Figure 2. NIH3T3 and MIN6 cells localized to the core and shell regions, respectively, of mixed multicellular spheroids. Fluorescence images of mixed multicellular spheroids containing DiI-labeled and CFSE-labeled cells after 72 h of incubation. Upper panels: DiI-labeled NIH3T3 mixed with CFSE-labeled 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 を添加したときの細胞配置の形成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。

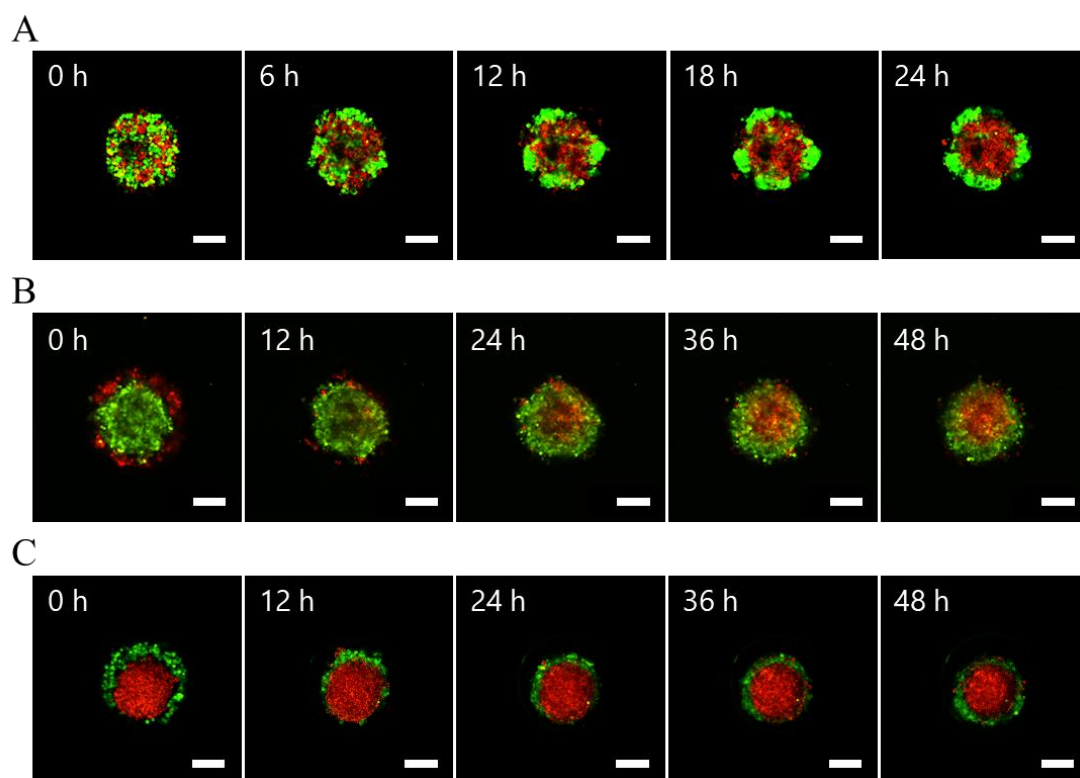


Figure 3. NIH3T3 and MIN6 cells migrated to the core and shell regions, respectively, of mixed multicellular spheroids. (A–C) Time-lapse fluorescence microscopy images of DiI-labeled NIH3T3/CFSE-labeled MIN6 spheroids. (A) Both the cell types were simultaneously added to the microwells. (B) Addition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

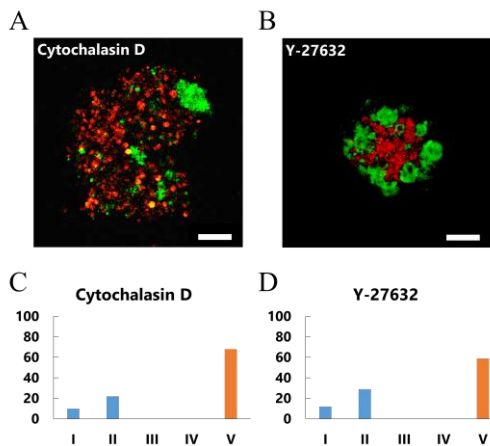


Figure 4. Forming NIH3T3-core/MIN6-shell distribution was inhibited by cellular migration inhibitors. (A and B) Fluorescence images of DiI-labeled NIH3T3/CFSE-labeled MIN6 spheroids prepared using (A) cytochalasin D-treated or (B) Y-27632-treated cells. Scale bars = 100 μ m. (C and D) Cellular distribution 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ランダム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。

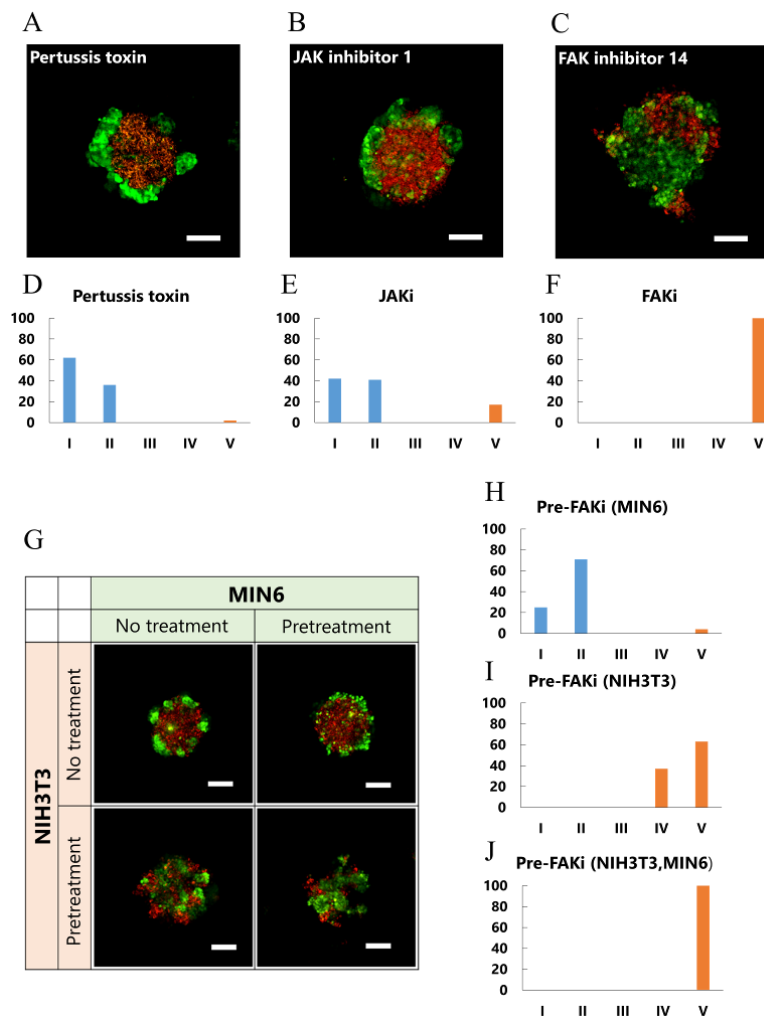


Figure 5. FAK signal in NIH3T3 cells mediates the core-shell-type distribution in NIH3T3/MIN6 spheroids. (A–C) DiI-labeled NIH3T3/CFSE-labeled MIN6 spheroids were prepared in the presence of inhibitors of pseudopod formation. (A) Pertussis toxin, (B) JAK inhibitor 1, and (C) FAK inhibitor 14. Scale bar = 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し、細胞遊走を抑制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、NIH3T3 と MIN6 中の collagen I と相互作用する integrin の発現を確認するために、collagen I との相互作用に関与する 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 に対する指向的な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。

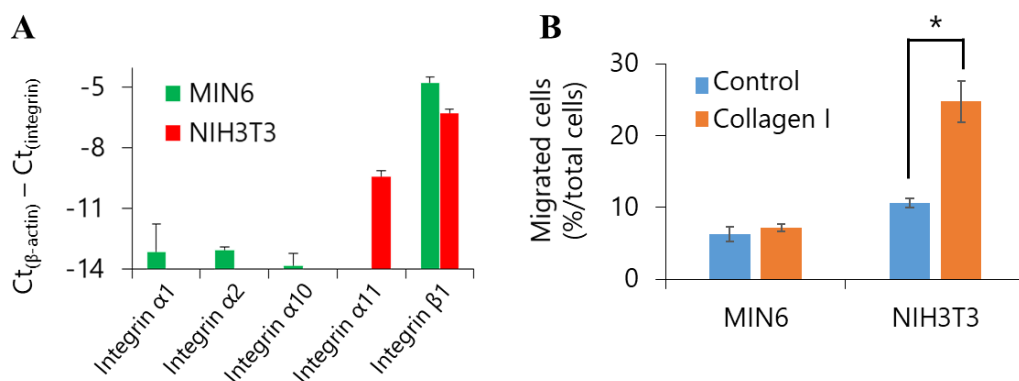


Figure 6. NIH3T3-collagen I interaction induced cellular migration to collagen I. (A) The mRNA expression of genes encoding integrin subsets that interacted with collagen I in MIN6 and NIH3T3 cells was measured by performing qRT-PCR. Results are expressed as the mean \pm SD of three independent experiments. (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認するために、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。

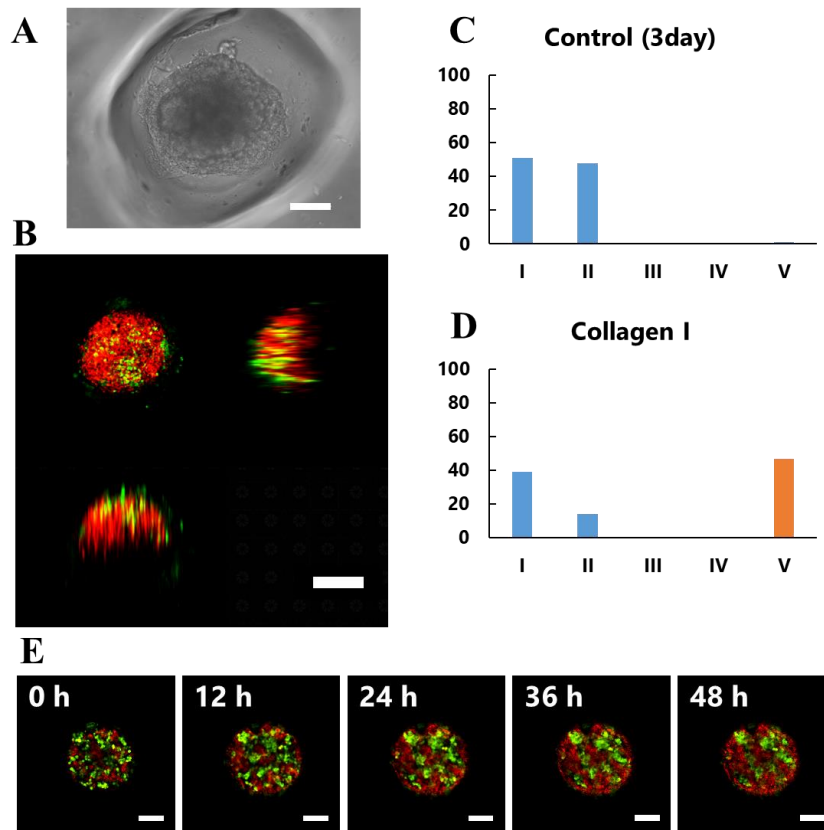


Figure 7. The core-shell-type distribution decreased in NIH3T3/MIN6 spheroids prepared in collagen I-coated microwells. (A) An image of a NIH3T3/MIN6 spheroid in a collagen I-coated microwell after 72 h of incubation. (B) A three-dimensional fluorescence image of a DiI-labeled NIH3T3/CFSE-labeled MIN6 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、細胞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 も細胞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、MIN6 がシェル側に遊走しているのではなく、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。Figure 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示している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、限られた培養環境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。

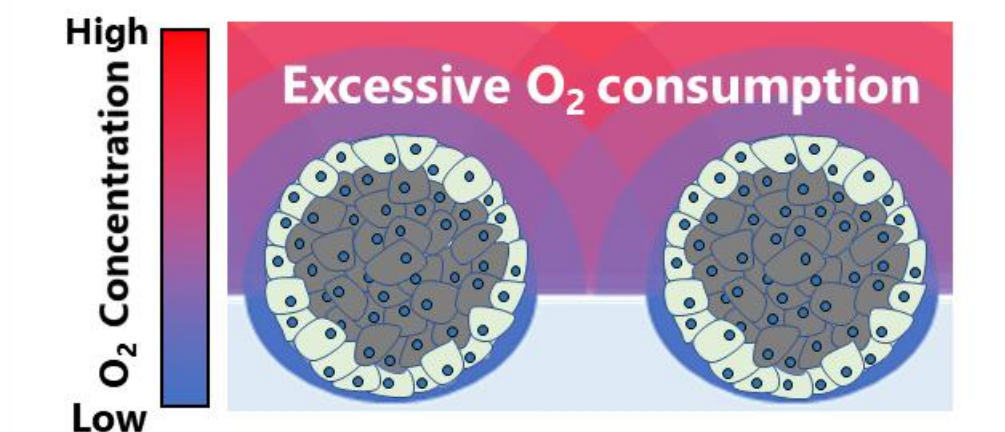


Figure 8. Excessive O_2 consumption, an environmental factor, reduces O_2 concentration in culture medium.

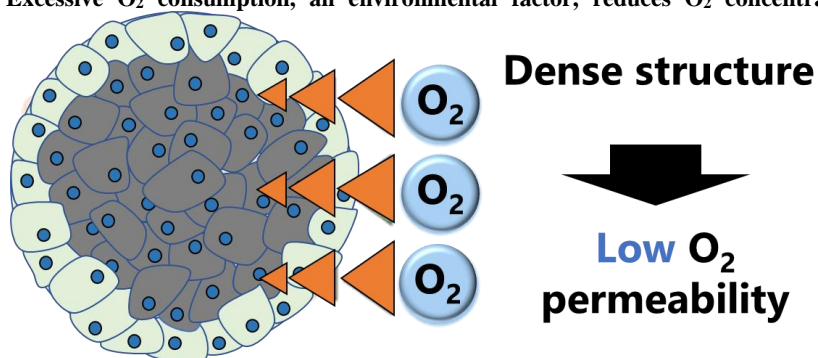


Figure 9. Dense structure, a structural factor, reduces O_2 permeability into the spheroid core and induces hypoxia.

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。

2.1.1 過酸化カルシウムを内包した PDMS からの酸素生成

過酸化カルシウムを質量比で 5、15、25 % の割合で混合した PDMS を固化し、水を積層後の水中の酸素濃度の変化を 24 時間経時的に測定した。その結果、過酸化カルシウムの混合量に応じて水中の酸素濃度が増加した (Fig. 10A)。続いて、24、48 時間の時点で水を交換したときの、交換直前と交換 24 時間後 (72 時間後) の酸素濃度を測定した。その結果、72 時間後においても過酸化カルシウムの混合量に応じて酸素濃度が増加した (Fig. 10B)。これらの結果より、PDMS に混合した過酸化カルシウムの混合量に応じて、少なくとも 72 時間は酸素が生成されることが示された。

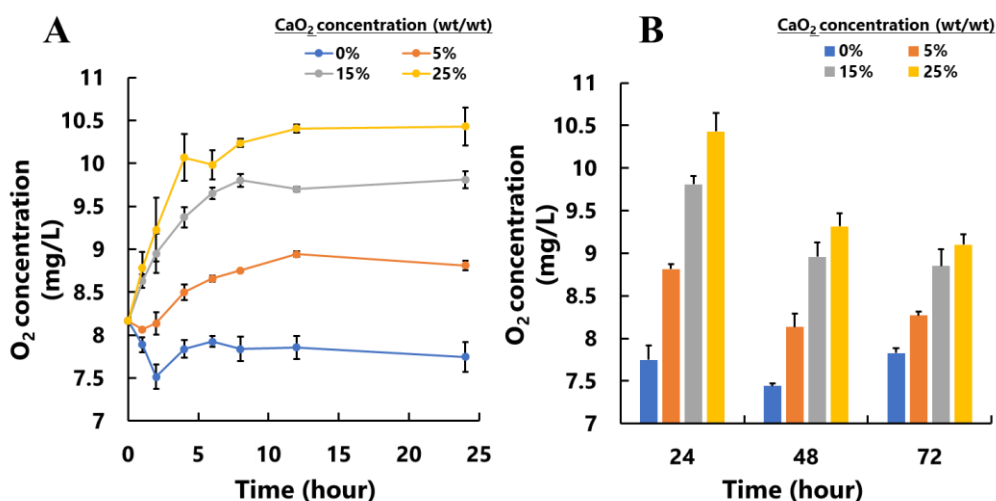


Figure 10. CaO₂-containing PDMS slowly released O₂. (A) O₂ release from PDMS containing 0%, 5%, 15%, or 25% CaO₂ for 24 h. Results are expressed as the mean \pm SD of five independent experiments. (B) Repetitive O₂ release from PDMS containing 0%, 5%, 15%, or 25% CaO₂ evaluated at 24, 48 and 72 h. Results are expressed as the mean \pm SD of five independent experiments.

2.1.2 酸素生成マイクロウェルの作製

過酸化カルシウムを質量比で 5、15、25 %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 (Fig. 11A)。作製した酸素生成マイクロウェルの断面を観察した結果、過酸化カルシウムの混合量によらず、マイクロウェル構造が形成されていた (Fig. 11B, table 1)。

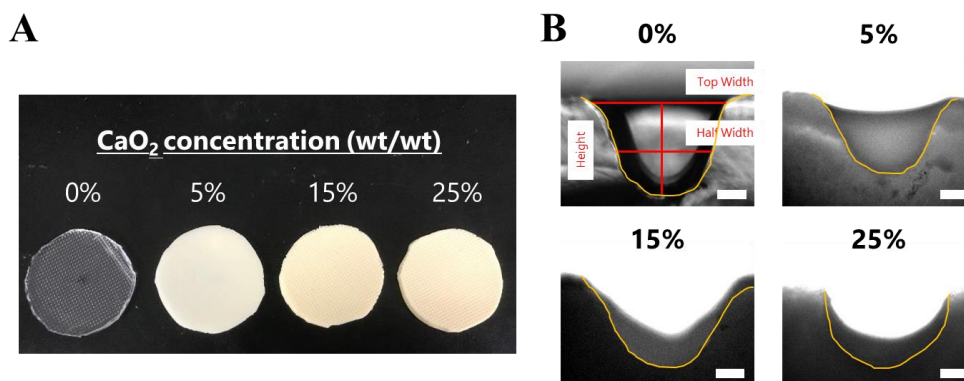


Figure 11. Microwells were formed by using PDMS containing different amounts of CaO₂. (A) Images of O₂-generating microwells. (B) Sectional images of O₂-generating microwells. Scale bar = 100 μm.

Table 1. Size parameters of the O₂-generating microwells.

	0%	5%	15%	25%
Top width (μm)	494 ± 30	520 ± 21	528 ± 19	462 ± 12
Half width (μm)	344 ± 15	331 ± 10	385 ± 29	395 ± 13
Height (μm)	308 ± 15	299 ± 20	277 ± 12	275 ± 19

Results are expressed as the mean ± SD of five measurements.

2.1.3 酸素生成マイクロウェルを用いた HepG2 スフェロイドの作製

酸素生成マイクロウェルを用いてヒト肝がん細胞株 HepG2 スフェロイドの作製を試みた。HepG2 を過酸化カルシウムの混合量が異なる酸素生成マイクロウェルに播種し、3日間培養したところ、過酸化カルシウムの混合量によらず細胞スフェロイドが形成された (Fig. 12A)。得られた細胞スフェロイドのサイズは、酸素生成マイクロウェル中の過酸化カルシウムの混合量に応じて増大した (Fig. 12B)。続いて、細胞スフェロイドを trypsin にて破壊し、トリパンブルー染色により生細胞数を測定したところ、酸素生成マイクロウェル中の過酸化カルシウムの混合量に応じて生細胞数は増加した (Fig. 12C)。また、Live/Dead 染色した細胞スフェロイドを透明化処理し、内部の細胞生存率を評価した (Fig12. D)。過酸化カルシウム含まないマイクロウェルにて作製した細胞スフェロイドでは、細胞スフェロイド内部に生細胞由来の蛍光がほとんど見られない一方で、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、細胞スフェロイド内部に生細胞由来の蛍光が観察された。これらの結果より、過酸化カルシウムの混合量に応じて生細胞数が増加した HepG2 細胞スフェロイドを作製することに成功した。

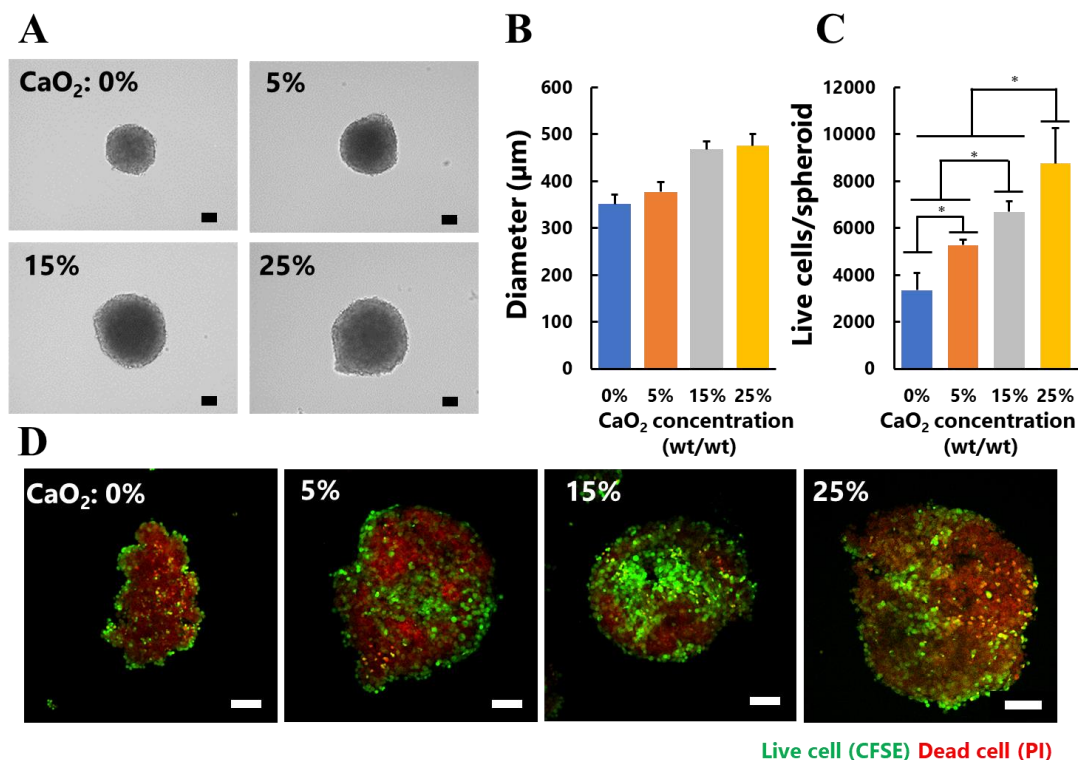


Figure 12. Size and viability of HepG2 spheroids increased by using O₂-generating microwells. (A) Images of HepG2 spheroids fabricated by using O₂-generating microwells. Scale bars = 100 µm. (B) The diameter of HepG2 spheroids fabricated by using O₂-generating microwells. Results are expressed as the mean ± SD of one hundred measurements. (C) The number of live cells in HepG2 spheroids fabricated by using O₂-generating microwells. Results are expressed as the mean ± SD of five measurements. *P < 0.05. (D) Fluorescence images of HepG2 spheroids fabricated by using O₂-generating microwells. Live and dead cells were stained with CFSE (green) and PI (red), respectively. Scale bar = 100 µm.

2.1.4 酸素生成マイクロウェルの低酸素環境改善効果の評価

酸素生成マイクロウェルの低酸素環境改善効果について、HepG2 スフェロイド作製環境中の酸素濃度を指標に評価した (Fig. 13A)。培養 24 時間後において、過酸化カルシウムを含まないマイクロウェルを用いた群と比較して、過酸化カルシウムを混合した群では酸素濃度が増加した。また、48 時間、72 時間後においても、質量比で 15%、25% の過酸化カルシウムを混合した酸素生成マイクロウェルでは、過酸化カルシウムを含まないマイクロウェルを用いた群と比較して酸素濃度が増加する傾向が見られた。続いて細胞スフェロイド中の低酸素環境改善効果を、低酸素応答性プローブ MAR を用いて評価した (Fig. 13B)。MAR は低酸素環境においてリダクターゼにより分解されることで蛍光活性を生じる低分子蛍光プローブである⁴³。HepG2 スフェロイド作製 1-25 時間の間 MAR を処理したのちに、

細胞スフェロイドを破壊し、フローサイトメトリー法により細胞中の MAR 由来の蛍光強度を測定した。酸素生成マイクロウェルを用いた群では、過酸化カルシウムを含まないマイクロウェルを用いた群と比較して有意に蛍光強度が低下した。また、HepG2 スフェロイド作製 48-72 時間の間 MAR を処理した場合においては、過酸化カルシウムの混合量に応じて蛍光強度が低下した。これらの結果より、過酸化カルシウムの混合量に応じて HepG2 細胞スフェロイド培養環境中の低酸素環境が緩和されることが示された。

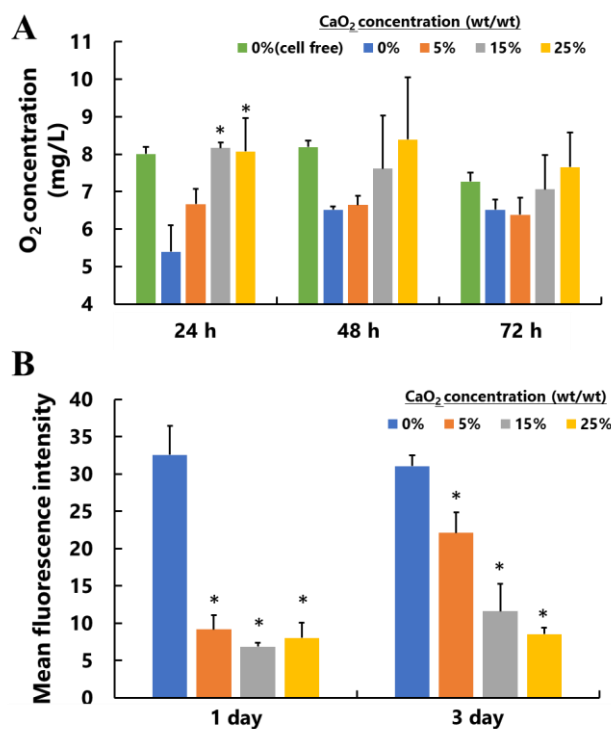


Figure 13. O₂-generating microwells prevented O₂ decrease in the culture media of HepG2 spheroids. (A) O₂ concentration in the culture media of HepG2 spheroids at 24, 48, and 72 h. Results are expressed as the mean \pm SD of three independent experiments. *P<0.05, v.s. 0% (control). (B) The mean fluorescence intensity of MAR (hypoxia-sensitive fluorescence probe)-treated HepG2 cells in spheroids fabricated by using O₂-generating microwells. The fluorescence intensity was measured by flow cytometry. Results were expressed as the mean \pm SD of four independent experiments. *P<0.05, v.s. 0% (control).

2.1.5 酸素生成マイクロウェルの汎用性評価

酸素生成マイクロウェルを用いて新たに 3 種類の細胞スフェロイドの作製を試みた。マウスインスリノーマ株 MIN6、マウスメラノーマ株 B16-BL6、マウス間葉系幹細胞 ASC を過酸化カルシウムの混合量が異なる酸素生成マイクロウェルに播種し、3 日間培養すること細胞スフェロイドを得た (Fig. 14A)。その結果、MIN6 を過酸化カルシウムを質量比で 25% 混合した酸素生成マイクロウェルで培養した場合を除いて細胞スフェロイドが得られた。また、B16-BL6 過酸化カルシウムを質量比で 25%の混合した酸素生成マイクロウェルで作製した細胞スフェロイドでのみ細胞スフェロイドが黒色を呈していた。続いて、細胞スフェロイドのサイズと生細胞数を測定した (Fig. 14. B,C)。ASC では酸素生成マイクロウェル中の過酸化カルシウムの混合量に応じて細胞スフェロイドのサイズおよび生細胞数が増加した。MIN6 では過酸化カルシウムを質量比で 5%混合した酸素生成マイクロウェル作製した細胞スフェロイドでサイズと生細胞数が最も増加した。また、B16-BL6 では過酸化カルシ

ウムを質量比で5%混合した酸素生成マイクロウェル作製した細胞スフェロイドで最もサイズが大きくなる一方で、過酸化カルシウムを質量比で 25 w/w%混合した酸素生成マイクロウェル作製した細胞スフェロイドでのみ生細胞が多数計測された。以上の結果より、細胞種に至適な量で過酸化カルシウム混合した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、細胞スフェロイドのサイズの増大および生細胞数を増加させることに成功した。

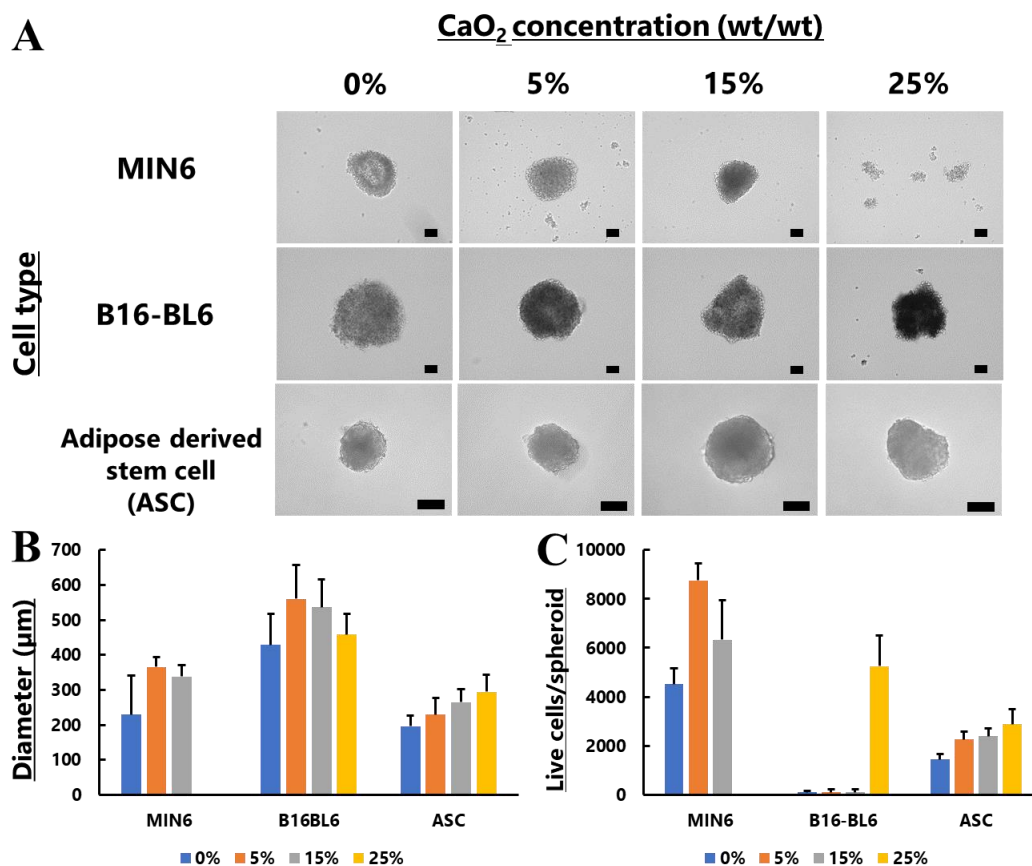


Figure 14. Spheroid size and live cell number of spheroids increased by using appropriate O₂-generating microwells. (A) Images of MIN6, B16-BL6 and ASC spheroids fabricated by using O₂-generating microwells. Scale bars = 100 μm. (B) The diameter of MIN6, B16-BL6 and ASC spheroids fabricated by using O₂ generating microwells. Results are expressed as the mean ± SD of one hundred measurements. (C) The number of live cells in MIN6, B16-BL6 and ASC spheroids fabricated by using O₂-generating-microwells. Results are expressed as the mean ± SD of five measurements.

2.1.6 考察

治療応用を目的とした細胞スフェロイドの調製には、均一性、および生産性が重要である。マイクロウェルが多数配置された基板を用いて細胞スフェロイドを調製する方法は、均一な細胞スフェロイドを多量に調製する方法として有効である。しかしながら、培養環境中の細胞密度が高い同方法では、培地中の溶存酸素濃度が低下し、調製した細胞スフェロイドの機能性および生存率が低下する。第二章第一節では、過酸化カルシウムを利用してマイクロウェルから酸素を徐放的に発生するシステムを構築することで、細胞スフェロイド培養環境中の酸素濃度の低下を抑制し、細胞生存率の向上した細胞スフェロイドの作製に成功した。

細胞培養に用いられる酸素の徐放化システムは、①ヘモグロビンの利用、②パーフルオロカーボンの利用、③過酸化物の利用の3つに大別される⁴⁴。①②は、酸素と親和性の高いマテリアルを利用する方法である。これらを利用する方法では、酸素濃度に応じた酸素放出制御が可能である一方で、あらかじめマテリアルに酸素を充填する必要があることや、マテリアルの加工が難しいことが課題である。一方で過酸化物は、酸素濃度に応じた酸素放出制御はできないものの、酸素の充填が不必要なことに加えて、加工が容易であることから簡易的なデバイスの作製に適している。

酸素ジェネレーターとして利用される過酸化物には、過酸化マグネシウム、過酸化カルシウム、過酸化水素がある⁴⁵。過酸化マグネシウム、過酸化カルシウムは、加水分解を受けて過酸化水素を発生し、これが分解することで水と酸素を発生する。過酸化物からの酸素生成速度は、過酸化水素、過酸化カルシウム、過酸化マグネシウムの順に速い。そのため、徐放性では酸化マグネシウムが優れるが、高純度の酸化マグネシウムを得るための精製に問題がある。そのため、本研究においても、酸化マグネシウムに次いで徐放性に優れる過酸化カルシウムを酸素生成マイクロウェルの作製に用いた。しかしながら、過酸化物自体は長期の培養においては十分な徐放性を有していないため、応用のためには加工が必要である。過酸化カルシウムを混合したPDMSでは、疎水性のPDMS中に過酸化カルシウムが内包されるため、過酸化カルシウムと水の反応は緩やかであり、持続的に酸素が生じる⁴⁰⁻⁴²。本研究においても、細胞スフェロイド培養時間である72時間後においても酸素が生成した。また、緩やかな過酸化カルシウムと水の反応は、細胞毒性を持つ中間生成物である過酸化水素の蓄積も抑制される。質量比で25%過酸化カルシウムを混合した条件で培地中の過酸化水素濃度を測定した際、水の積層初期に2.5 μM 程度検出されるものの、その後は最低感度である1 μM を下回った (data not shown)。2.5 μM はHepG2細胞においては細胞毒性が見られない十分低い濃度であった。また、Coronelらは25%の過酸化カルシウムを含有するPDMS上でラット臍島を培養した時には細胞毒性が見られなかったことを報告している⁴¹。よって、過酸化カルシウムをPDMSに内包した酸素生成マイクロウェルも、同様に緩やかな反応性によって細胞毒性を抑えられていると考えられる。

低酸素環境および高酸素環境はともに細胞機能に影響を及ぼす。細胞は呼吸によってエネルギーとなる ATP を産生するが、その経路には酸素を用いる好気呼吸と酸素を用いない嫌気呼吸がある。好気呼吸では、1 グルコース当たり 38ATP を産生する一方で、嫌気呼吸、特に乳酸発酵系においては 1 グルコース当たり 2ATP の産生になるため、大きくエネルギーの産生効率が異なる⁴⁶。さらに、細胞スフェロイドにおいては細胞が密に凝集しているためにグルコースも枯渇しやすいと考えられ、低酸素環境による細胞機能の低下は顕著に表れる。また、高酸素環境において細胞は酸化ストレスを受ける⁴⁷。酸化ストレスはミトコンドリア機能を傷害することで、細胞の老化および機能の低下を引き起こす。そのため、適切な酸素濃度を維持することが重要である。酸素生成マイクロウェルを用いて HepG2 スフェロイドを作製した際に、過酸化カルシウムを含まないマイクロウェルでは酸素濃度が細胞フリーの環境と比較して約 65%程度低下した。一方で、質量比で 25%の過酸化カルシウムを含む酸素生成マイクロウェルを用いた際には、細胞フリーの環境と同等の酸素濃度を示した。この結果は、酸素生成マイクロウェルが酸素濃度の低下を抑制するとともに、高酸素環境を生じないことを示している。

過酸化カルシウムを含まないマイクロウェルにおいて、24 時間後と比較して 48 時間後には酸素濃度が増加した。この結果は、低酸素環境により細胞死が生じ、酸素の消費が低減したためであると考えられる。MAR を用いた検討では、25 時間後には、過酸化カルシウムの混合量によらず差が見られなかった。一方で、72 時間後においては混合量に応じて低酸素環境が緩和した。この原因として、酸素生成マイクロウェルの酸素生成能の低下および細胞スフェロイド中の細胞数の増加による酸素消費量の増加が考えられる。過酸化カルシウムを混合した PDMS からの酸素生成の持続性を評価した結果から、25 時間後と 72 時間後では酸素の生成量は低下していることが示唆される。また、すべての播種細胞がマイクロウェル中に入った時、理論上マイクロウェル当たり約 6000 細胞がスフェロイド中に含まれる。質量比で 25%の過酸化カルシウムを含む酸素生成マイクロウェルで作製した HepG2 スフェロイドでは細胞スフェロイドあたり 9000 程度の細胞数であったことから、細胞スフェロイド中で細胞増殖が促進していることが示唆される。

HepG2、MIN6、B16-BL6、ASC では、酸素生成マイクロウェルによる効果の程度が異なっていた。特に MIN6 においては、質量比で 5%の過酸化カルシウムを含む酸素生成マイクロウェルを用いた際に最も細胞数が増加した。この結果から、細胞によって最適な過酸化カルシウム混合比を検討する必要があることが示される。また、15%以上において、細胞数が低下した原因としては、過酸化水素濃度および酸素濃度の過剰な増加が考えられる。細胞により、抗酸化酵素の発現が異なるために酸化ストレスの影響が異なり、MIN6 においては酸化ストレスの影響が顕著に表れたと考えられる。また、B16-BL6 においては過酸化カルシウムの混合量が低いときは生細胞を含む細胞スフェロイドが形成されない一方で、25%の過酸化カルシウムを含む酸素生成マイクロウェルを用いた際には、生細胞を含む細胞スフェロイドが形成された。この結果は、従来細胞スフェロイドが作製できなかった細胞において

も、酸素生成マイクロウェルを用いることで細胞スフェロイドを作製できる可能性を示唆する。B16-BL6 のようながん細胞スフェロイドは、生体内の腫瘍組織により近いモデルとして利用されることから、ドラッグスクリーニングの幅を広げられる可能性が考えられる。

以上、第二章第一節では、過酸化カルシウムを含む PDMS 製の酸素生成マイクロウェルが、持続的に酸素を供給するシステムを確立することにより、細胞スフェロイド培養環境中の酸素濃度の低下の抑制が可能であることを示すとともに、細胞生存率が向上した高機能細胞スフェロイドの開発に成功した。

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させることが報告されている^{48,49}。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⁵⁰。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^{51,52}。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。

2.2.1 GMS の作製

ゼラチン微粒子は W/O エマルション法により作製した⁵³。SEM 観察により、GMS の表面には多数の小孔が観察された (Fig. 15A, B)。水中においては球状の構造が観察された (Fig. 15C)。また、水中での粒子径は 10~100 μm であり、その平均粒子径は $37.4 \pm 16.2 \mu\text{m}$ であった (Fig. 15D)。HepG2 への細胞毒性を評価した結果、粒子量が多い場合にも細胞毒性は認められなかった (Fig. 15E)。

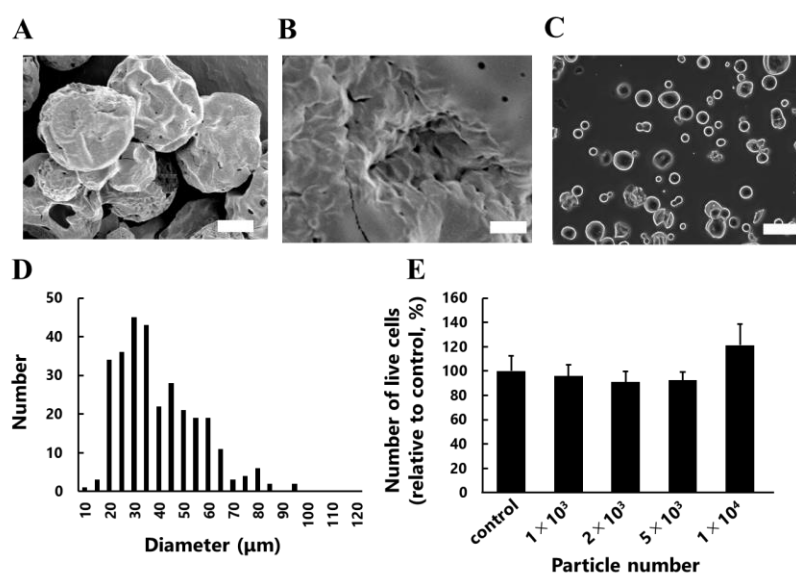


Figure 15. Multiporous GMS were fabricated by W/O emulsion technique. (A, B) SEM images of multiporous freeze-dried GMS fabricated by W/O emulsion technique. (A) Scale bar = 10 μm . (B) Scale bar = 1 μm . (C) An image of GMS in water. Scale bar = 100 μm . (D) The histograms of the diameter of 300 GMS. (E) The number of live HepG2 cells cultured with GMS, estimated by WST-8 assay. Results are expressed relative to control groups as the mean \pm SD of four experiments. There are not significant differences.

2.2.2 GMS 内包 HepG2 スフェロイドの作製

HepG2 と GMS を各混合比 (GMS/HepG2: 0.02、0.05、0.1、0.2) で混合し、マイクロウェルに播種することで GMS 内包 HepG2 スフェロイド (HepG2/GMS スフェロイド) を作製した。GMS/HepG2 混合比が 0.2 の場合を除き、GMS 内包 HepG2 スフェロイドが形成された (Fig. 16A)。細胞スフェロイドのサイズは GMS/HepG2 混合比率の増加に伴い増大した (Fig. 16A, B)。CFSE 標識した HepG2 と rhodamine 標識した GMS を用いて、HepG2/GMS スフェロイドを作製し、共焦点レーザー顕微鏡により観察した (Fig. 16C)。その結果、rhodamine 由来の蛍光が、HepG2/GMS スフェロイド中に観察された。これより、GMS が HepG2 細胞スフェロイド中に内包されていることが示唆された。以上の結果より、GMS を内包した HepG2 スフェロイドの作製に成功した。

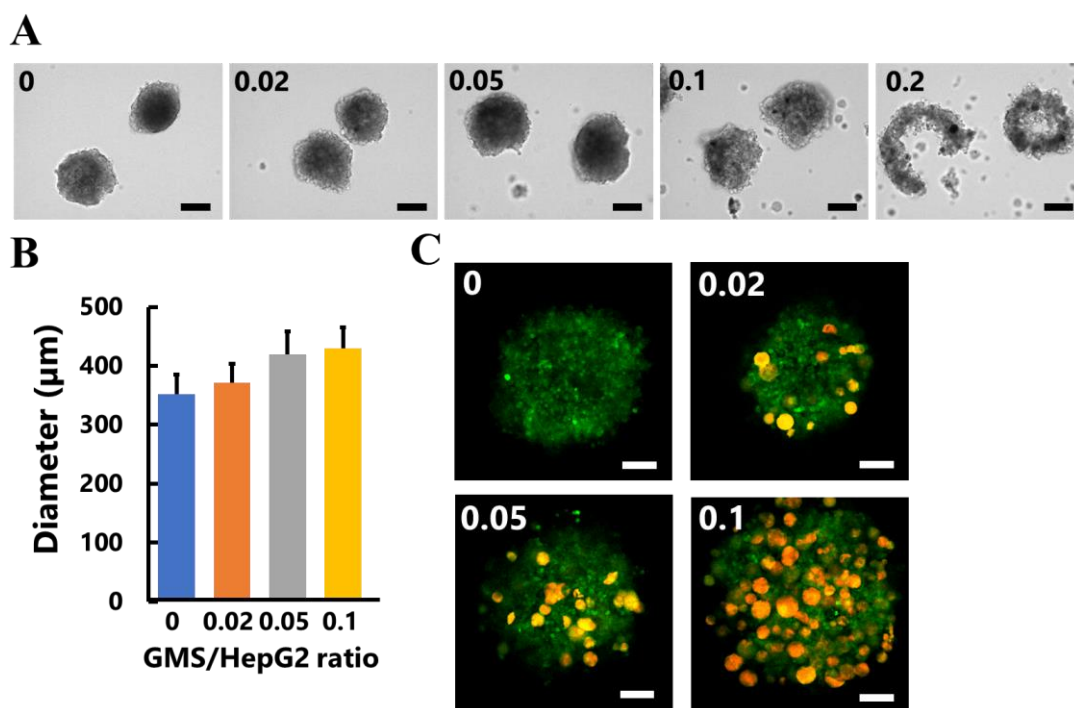


Figure 16. HepG2/GMS spheroids were successfully obtained by culturing HepG2 in microwell with GMS. (A) Images of HepG2/GMS spheroids fabricated by culturing with different amount of GMS. Upper left numbers indicate the GMS/HepG2 ratio. Scale bar = 200 µm. (B) The diameter of HepG2/GMS spheroids. Results are expressed as the mean ± SD of one hundred measurements. (C) Fluorescence images of CFSE-labeled HepG2 (green) /rhodamine-labeled GMS (red) spheroids. Upper left numbers indicate the GMS/HepG2 ratio. Scale bar = 100 µm.

2.2.3 GMS の内包による HepG2 スフェロイド内低酸素環境改善効果の評価

細胞スフェロイド中の低酸素環境改善効果を、低酸素応答性プローブ MAR⁴³ を用いて評価した (Fig. 17)。作製した HepG2 スフェロイドに MAR を処理したのち、細胞スフェロイドを破壊しフローサイトメトリー法により細胞中の MAR 由来の蛍光強度を測定した。HepG2/GMS スフェロイドでは、GMS を内包しない HepG2 スフェロイドと比較して MAR 由来の蛍光強度が低下した。さらに、GMS の混合比の増加に伴い蛍光強度が低下する傾向にあり、混合比が 0.05 以上ではほとんど変わらなかった。以上の結果より、GMS の内包により HepG2 スフェロイド内の低酸素環境が改善することが示された。

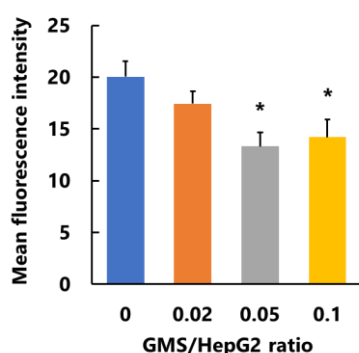


Figure 17. Incorporation of GMS into HepG2 spheroids resuscitated hypoxia in spheroids. The mean fluorescence intensity of MAR (hypoxia-sensitive fluorescent probe)-treated HepG2 cells in HepG2/GMS spheroids. Results are expressed as the mean \pm SD of three experiments. * $P < 0.05$, v.s. HepG2 spheroid group (GMS/HepG2 ratio = 0).

2.2.4 HepG2/GMS スフェロイド中の細胞生存率の評価

HepG2/GMS スフェロイドを trypsin により破壊し、トリパンブルー染色により細胞スフェロイドあたりの生細胞数を評価した (Fig. 18A)。GMS 内包細胞スフェロイドでは生細胞数が増加する傾向がみられた。続いて、Live/Dead 染色により、スフェロイド内部の細胞生存率を評価した (Fig. 18B)。GMS を内包しない HepG2 スフェロイド中ではほとんど生細胞由来の蛍光が観察されない一方で、GMS を内包する細胞スフェロイドでは、生細胞由来の蛍光が多数観察された。以上の結果より、GMS の HepG2 スフェロイドへの内包により細胞スフェロイド中の細胞生存率が改善することが示唆された。

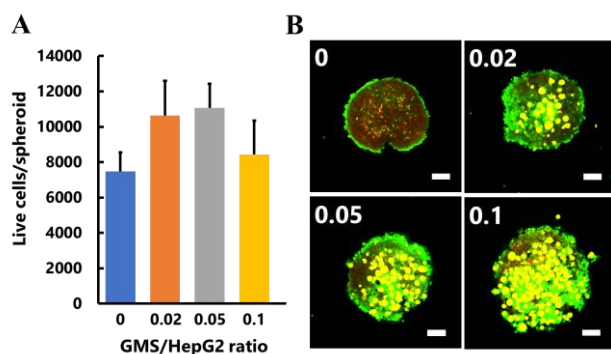


Figure 18. Incorporation of GMS into HepG2 spheroids increased live cell number in spheroids. (A) The number of live cells in HepG2/GMS spheroids. Results are expressed as the mean \pm SD of three measurements. (B) Fluorescence images of HepG2/GMS spheroids. Live and dead cells were stained with CFSE (green) and PI (red), respectively. Upper left numbers indicate the GMS/HepG2 ratio. Scale bar = 100 μ m.

2.2.5 HepG2/GMS スフェロイドの CYP1A1 活性評価

Ethoxyresorufin-*O*-deethylase (EROD) アッセイにより、HepG2/GMS スフェロイドのシトクロム P450 (CYP1A1) 活性を評価した。GMS を内包しないスフェロイドと比較して細胞あたりの代謝活性が有意に増加した (Fig. 19A)。一方で、HepG2/GMS スフェロイド中の HepG2 の CYP1A1 mRNA 発現量を評価した。GMS を内包しない HepG2 スフェロイドと比較して発現量が低下した (Fig. 19B)。以上の結果から、HepG2 スフェロイドへの GMS の内包により、HepG2 の代謝活性は向上する一方で mRNA 発現量は低下することが示された。

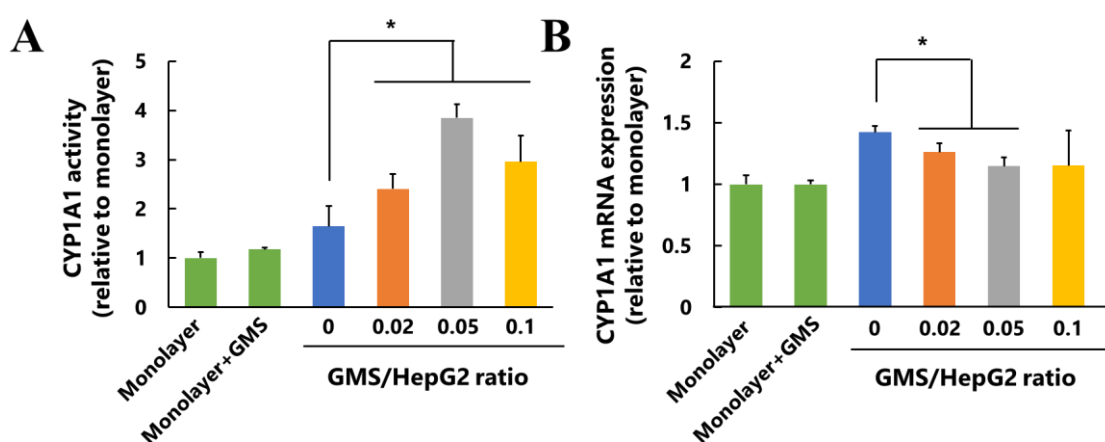


Figure 19. Incorporation of GMS increased CYP1A1 metabolic activity of HepG2 in spheroids. (A) The EROD activity of HepG2 cells. The EROD activity was normalized to WST-8 activity and expressed relative to monolayer-cultured HepG2 cells. Results are expressed as the mean \pm SD of four independent experiments. * $P < 0.05$. (B) The mRNA expression of CYP1A1 in HepG2 cells. The mRNA expression was normalized to that of β -actin and expressed relative to monolayer-cultured HepG2 cells. Results are expressed as the mean \pm SD of three independent experiments. * $P < 0.05$.

2.2.6 考察

肝細胞もしくは肝がん細胞からなる細胞スフェロイドは、肝組織モデルもしくは肝がんモデルとしてドラッグスクリーニングや細胞移植治療への応用が期待される⁷。細胞治療への応用を考えたとき、細胞スフェロイドは懸濁状態の細胞と比較して細胞機能と生着率に優れている。しかしながら、細胞スフェロイドの中心部の細胞は酸素不足のために細胞本来の機能を発揮することができず、細胞治療においては不利に働く³⁸。本研究では、GMSのHepG2スフェロイドへの内包によりスフェロイド内部の低酸素環境が改善されるとともに、HepG2の細胞生存率および代謝活性が向上した。これらの結果から、GMSが細胞スフェロイド内部で酸素の透過経路として機能したことが示唆される。そのため、GMSを内包したHepG2スフェロイドは、GMSを内包しないHepG2スフェロイドより優れていると考えられる。続いて、ドラッグスクリーニングへの応用を考えたとき、肝細胞スフェロイドは

細胞-細胞間相互作用や細胞-細胞外基質間相互作用に基づく機能を反映することから、単層培養した肝細胞と比較して優れていると考えられる。しかしながら、肝細胞のみで構成される細胞スフェロイドは肝臓のモデルとしては不十分である。肝臓は細胞だけでなく、肝星細胞のような非肝実質細胞から産生される細胞外基質も同様に組織を構成する要素となっており、薬剤の効果や耐性に間質細胞や間質細胞が産生する細胞外基質が関与していることも報告されている⁵⁵。一方で、間質細胞は細胞スフェロイド中で、ゼラチンのような細胞外基質のもととなる基質がなければ細胞外基質を効率的に産生できないことも報告されている⁵⁶。そのため、本研究で行ったゼラチン微粒子を肝細胞スフェロイドに内包するアプローチは細胞スフェロイド内への細胞外基質の導入による高機能な肝組織モデルを作製するためにも有用であると考えられる。

ゼラチンハイドロゲルは、生体適合性に優れ、細胞接着が可能であり、加工しやすい素材であることから、組織工学の分野では細胞の足場として汎用される。細胞スフェロイドへの内包を考えた際にも、ゼラチンは他のマテリアルと比較して優れている。Bratt-leal らは、胚性幹細胞スフェロイド中へのゼラチン、アガロース、poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) 微粒子の内包を比較している⁵⁷。3つのマテリアルの中でゼラチン微粒子は最も効率的に細胞スフェロイド中に内包された。本研究においても、GMSはHepG2と混合しマイクロウェル中に播種するだけで、HepG2スフェロイド中に内包された。このことは、細胞-GMS間相互作用が働いた結果であると考えられる。一方で、GMS/cell混合比率が0.1を超えたとき細胞スフェロイドが形成されなかった。このことは、GMSの増加により、細胞間および細胞-GMS間の接着点が減少し、マイクロウェル中で細胞スフェロイドの形成に必要な相互作用が弱まったためであると考えられる。

本研究では、W/Oエマルション法により作製したGMSの粒子径は10-100 μm と不均一であった。GMSを細胞医薬に応用するためには、より均一なサイズを持ったGMSを作製する必要がある。Hayashi and Tabata らは、約100 μm のゼラチン微粒子を内包した時、細胞スフェロイド中の間葉系幹細胞の生存率が最も向上したことを報告している⁵⁸。しかし、大きすぎるGMSは、細胞間相互作用を減少させることで、細胞スフェロイドの安定性を低下させる可能性がある。また、GMSの至適サイズは細胞の種類により変化すると考えられるために、細胞ごとの最適化が必要である。

本研究では、HepG2スフェロイドへのGMSの内包により、細胞スフェロイド中の低酸素環境が改善し、細胞生存率が向上した。しかしながら、低酸素環境の緩和と細胞生存率の向上の間の関係性は明らかにしていない。Live/Dead染色ではGMSの周囲において、より生細胞が増加している様子が観察される。そのため、GMSの内包による生存率の向上は、細胞-細胞外基質間相互作用による足場依存的なアポトーシスの回避による効果の可能性も考えられる⁵⁹。

CYP1A1は、主に外因性化学物質といくつかの内因性化学物質の酸素を使用した代謝に関与している。7-Ethoxy-resorfin-O-deethylase活性はCYP1A1活性の指標として用いられる。

本研究では、細胞スフェロイド中の HepG2 の EROD 活性は、ゼラチン微粒子の内包により増加した。一方で、CYP1A1 mRNA の発現量は GMS の内包により低下した。これまでに病態情報薬学分野では、HepG2 スフェロイドのサイズの増大に従って、CYP1A1 活性が上昇することを報告している³⁶。さらに、オスの Sprague Dawley rats を低酸素環境に置くと、CYP1A1 mRNA 発現量が上昇することが報告されている⁶⁰。これらのことから、低酸素環境により、HepG2 中の CYP1A1 mRNA の発現量を増大することが示唆される。そのため、HepG2/GMS スフェロイドでは低酸素環境が緩和されるため、CYP1A1 mRNA 発現量が低下していると考えられる。一方で、EROD 活性には酸素が必要であるために、低酸素環境が改善されている GMS を内包した HepG2 スフェロイドでは EROD 活性が向上したと考えられる。

GMS は薬剤キャリアとしても用いられる^{61,62}。そのため、薬剤を搭載した GMS をスフェロイドに内包することで新たな機能を付与できる可能性がある。薬剤搭載 GMS については第三章にて詳しく取り上げる。

以上、第二章第二節では、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 スフェロイドを開発に成功し、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⁶³。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⁶⁴。これまでに、MSC の細胞スフェロイド化や薬物による前処理が、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⁶⁵⁻⁷⁰。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^{71,72}。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⁷³。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 の一般的な調整法である 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^{52,62}。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⁷⁴。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⁷⁵。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。

3.1. GMAの合成

フルオレスカミン法により算出したゼラチンのアミノ基に対し、3倍量の無水メタクリル酸を反応させることでGMAを合成した(Fig. 20A)。フルオレスカミン法により算出したアミノ基修飾率は97.4%であった。続いて、合成したGMA溶液にラジカル反応開始剤であるIrgacure2959を添加し、紫外線を照射した(Fig. 20B)。紫外線照射前のサンプルは添加したdextran blue水溶液と速やかに混和したのに対し、照射後のサンプルでは混和せず、dextran blue水溶液が積層した(Fig. 20C)。以上の結果より、紫外線照射によりゲル化するGMAを得た。

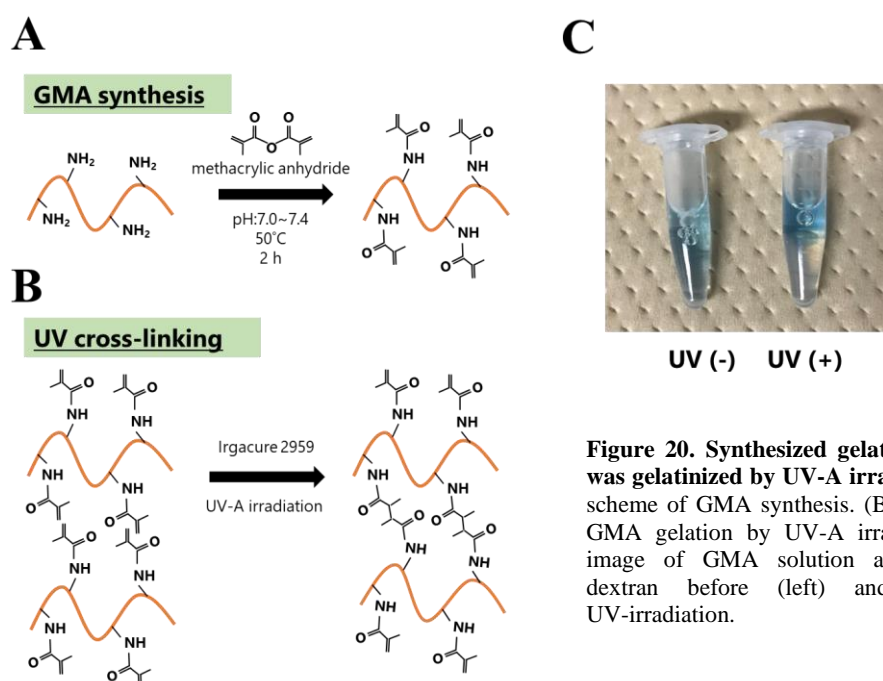


Figure 20. Synthesized gelatin methacrylate was gelatinized by UV-A irradiation. (A) The scheme of GMA synthesis. (B) The scheme of GMA gelation by UV-A irradiation. (C) An image of GMA solution added with blue dextran before (left) and after (right) UV-irradiation.

3.2. w/w-mGMS の作製

GMA の終濃度が 2 wt%、PEG の終濃度が 15、20、25、30 wt% となるように混合し、紫外線を照射後に遠心を行い、得られた沈殿を再懸濁し観察した (Fig. 21A)。PEG 濃度が 20 w/w% 以上のとき、球形の粒子 (w/w mGMS) と凝集物が観察された。また、PEG 濃度が 30 w/w% では、凝集物がほとんど観察されなかった。続いて、PEG の終濃度を 30 w/w% に固定し、GMA の終濃度を 1、2、3、4、5 w/w% に変えて、同様に w/w mGMS を調製した (Fig. 21B)。その結果、すべての GMA 濃度において w/w mGMS が得られた。GMA 濃度の上昇に伴い粒子径が上昇した。続いて w/w mGMS を凍結乾燥し、凍結乾燥後の w/w mGMS のタンパク質量を BCA protein assay により測定した (Fig. 21C)。その結果、GMA 濃度の上昇に伴い、GMA の収率が増加した。以上の結果をもとに、以降の検討では、PEG の終濃度を 30 w/w%、GMA の終濃度を 2 w/w% として w/w mGMS を作製した。続いて、rhodamine 標識した GMA を用いて w/w mGMS を作製し、蛍光顕微鏡を用いて観察した (Fig. 21D)。粒子中に rhodamine 由来の赤色蛍光が観察されたことから、得られた粒子が GMA 由来のものであることが示された。

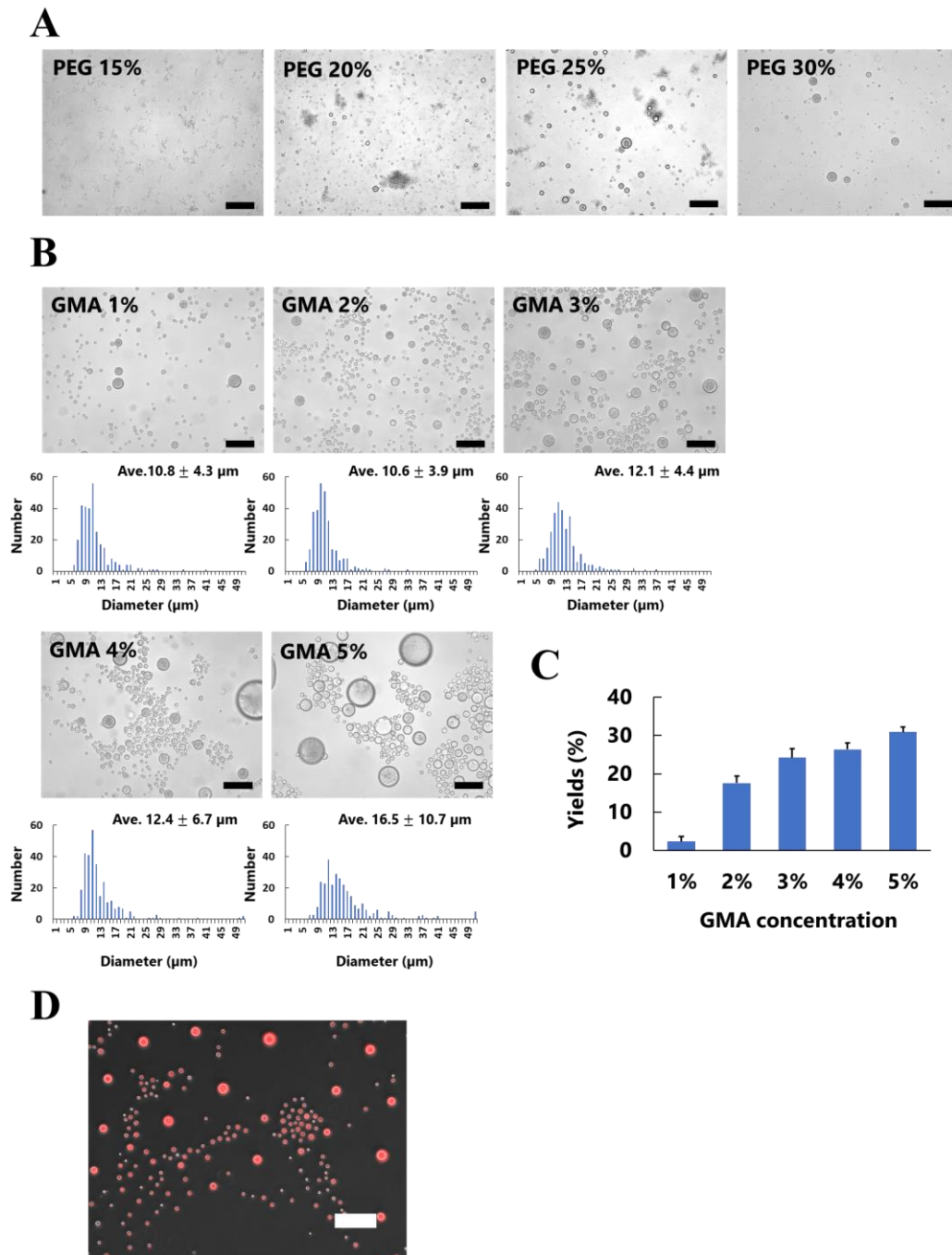


Figure 21. w/w mGMS were fabricated by using aqueous two-phase system and GMA gelation with UV-A irradiation. (A) Images of w/w mGMS after fabrication by using the different concentration of PEG solution. Scale bar = 100 μm . (B) Images and the histograms of the diameter of 300 w/w mGMS after the fabrication by using different concentration of GMA solution. Scale bar = 100 μm . (C) The yields of w/w mGMS, the rate of the protein content of recovery with GMA content before fabrication. The protein and GMA content were estimated by BCA protein assay. Results are expressed as the mean \pm SD of four independent experiments. (D) A fluorescence image of w/w mGMS after the fabrication by using rhodamine-labeled GMA. Scale bar = 100 μm .

3.3. w/w mGMS と w/o GMS の物性評価

w/w mGMS の物性を w/o GMS と比較した。w/w mGMS の水中での平均粒子径は $14.0 \pm 2.7 \mu\text{m}$ であり、w/o GMS の平均粒子径 $35.2 \pm 19.9 \mu\text{m}$ と比較して小さく、また均一性も高かった (Fig. 22A, B)。w/w mGMS の含水による重量の変化 (膨潤率) は 11.3 ± 1.2 倍であり、w/o GMS の膨潤率 29.2 ± 1.7 倍と比較して小さかった (Fig. 22C)。また、w/w mGMS の含水率は $91.1 \pm 0.9\%$ であり、w/o mGMS の含水率 96.6 ± 0.2 よりも低かった (Fig. 22D)。凍結乾燥した両粒子の表面を SEM 観察したところ、w/o GMS は粒子表面に多数のひだが観察された (Fig. 22E, F) が、w/w mGMS の表面は平滑であった (Fig. 22G, H)。

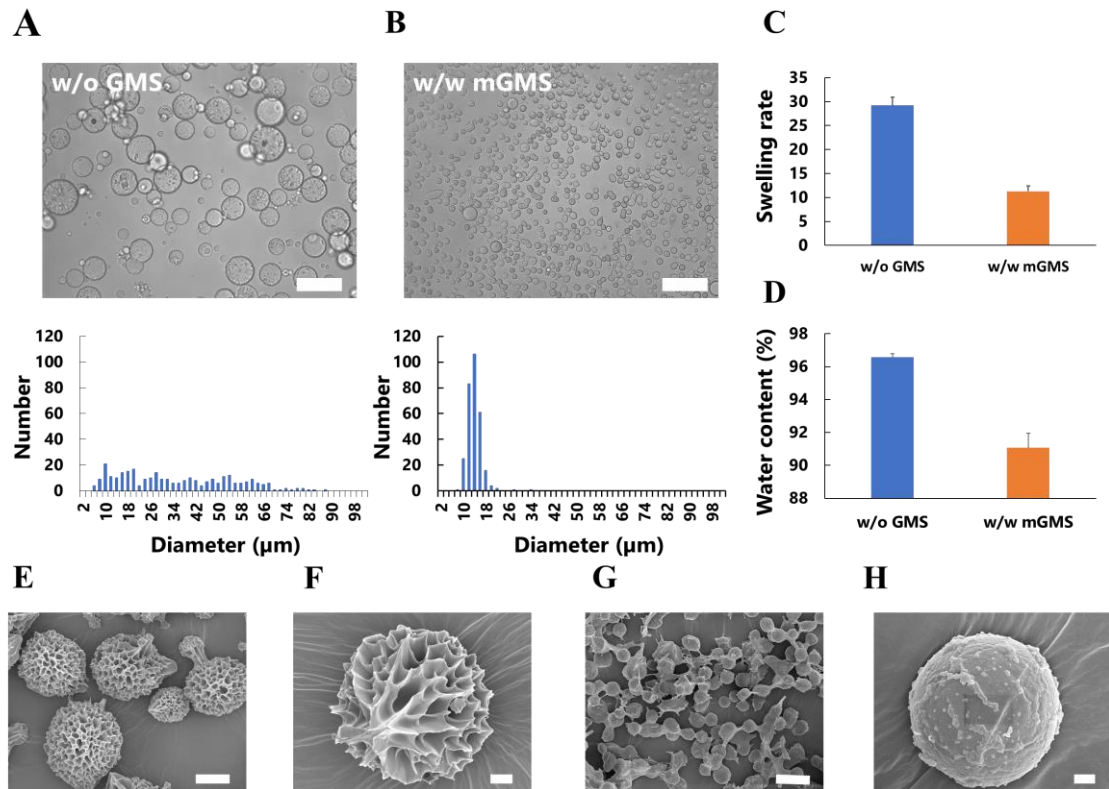


Figure 22. w/w mGMS was smaller and more uniform than w/o GMS. (A,B) Images and the histogram of the diameter of 300 w/o GMS (A) and of 300 w/w mGMS (B). Scale bar = 100 μm . (C,D) Swelling rates (C) and water contents (D) of w/o GMS and of w/w mGMS. Results are expressed as the mean \pm SD of four independent experiments. (E-H) SEM images of w/o GMS (E,F) and of w/w mGMS (G,H). Scale bar = 20, 5, 20 and 1, respectively (E-H).

3.4. w/w mGMS と w/o GMS の安定性の比較

w/w mGMS と w/o GMS の水溶液中での安定性を比較した。コラゲナーゼ非存在下では両粒子とも 2 週間ほとんど分解せず、上清中へのゼラチンの放出はほとんど認められなかった (Fig. 23A-C)。コラゲナーゼ存在下にて w/o GMS は速やかに分解され、2 週間後には残存粒子が観察されなかった一方で、w/w mGMS は分解したものの、2 週間後においても粒子が残存した (Fig. 23D-F)。以上の結果から、w/w mGMS は、w/o GMS と比較して酵素に対する安定性が高いことが示された。

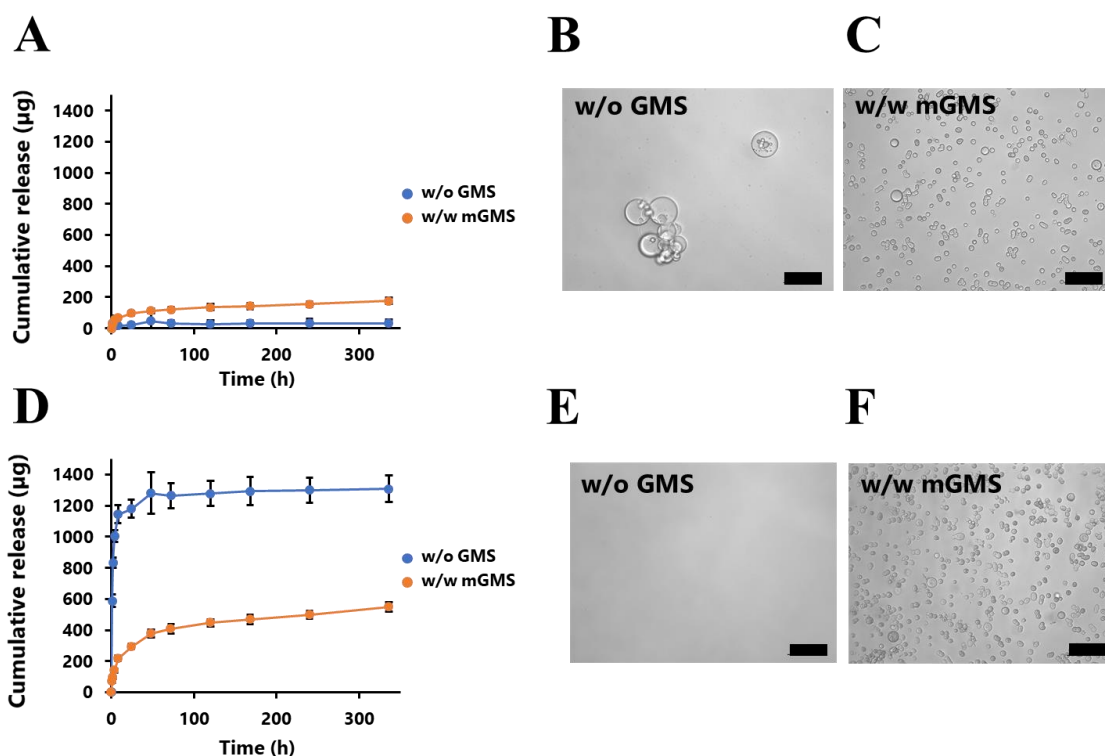


Figure 23. Stability of w/w mGMS was higher than that of w/o GMS. (A,D) The cumulative release of protein from 1 mg of w/o GMS or of w/w mGMS with (D) or without (A) collagenase I for 14 days. Results are expressed as the mean \pm SD of four independent experiments. (B,C,E,F) Images of w/o GMS (B,E) or w/w mGMS (C,F) 14 days after the treatment with (E,F) or without (B,C) collagenase I. Scale bar = 100 μ m.

3.5. w/w mGMS への bFGF プレローディング

Fluorescein 標識 bFGF (fluorescein-bFGF) を添加した rhodamine 標識 GMA (rhodamine-GMA) 溶液を用いて w/w mGMS を作製し、得られた w/w mGMS を蛍光顕微鏡で観察したところ、Fluorescein-bFGF 由来の緑色蛍光と Rhodamine-GMA 由来の赤色蛍光の共局在が認められた (Fig. 24)。これより、w/w mGMS 作製時に bFGF を添加することで w/w mGMS への bFGF のプレローディングが可能であることが示された。

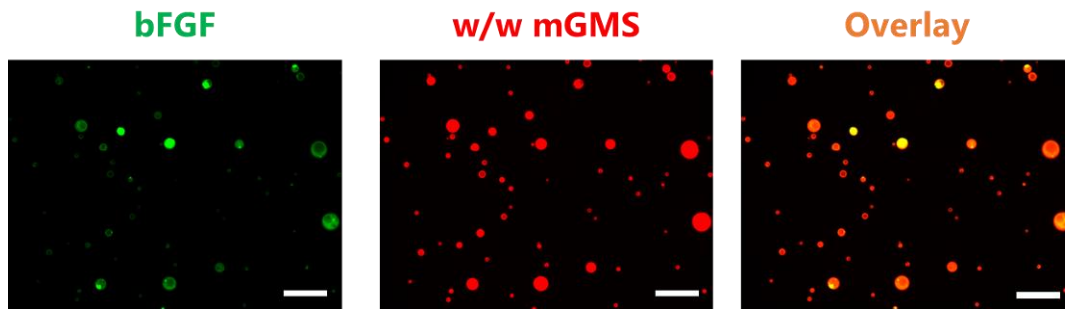


Figure 24. bFGF was successfully pre-loaded in w/w mGMS. Fluorescence images of rhodamine-labeled w/w mGMS loading fluorescein-labeled bFGF. Scale bar = 100 μm .

3.6. bFGF の w/w mGMS と w/o GMS への搭載効率の比較

bFGF の w/w mGMS と w/o GMS への搭載効率を比較した。w/w mGMS 作製に用いる GMA の質量に対し、0.1、1、10 $\mu\text{g}/\text{mg}$ (bFGF weight (μg)/GMA weight (mg)) で fluorescein-bFGF を混合し w/w mGMS へのプレローディングを行い凍結乾燥した。また、作製した w/o GMS と w/w mGMS の質量に対し、0.1、1、10 $\mu\text{g}/\text{mg}$ の fluorescein-bFGF 含む溶液を混合し、凍結乾燥することでポストローディングを行った。凍結乾燥粒子を再懸濁し、遠心後の上清中の fluorescein-bFGF 由来の蛍光強度を指標に搭載効率を算出した (Fig. 25)。搭載量に関わらず、w/w mGMS にプレローディングしたときにより高い搭載効率を得られた。また、両粒子へのポストローディングでは、搭載量の増加に伴い搭載効率が低下した一方で、w/w mGMS にプレローディングした時には搭載効率が維持された。以上の結果より、w/w mGMS への bFGF のプレローディングは従来のポストローディングする方法と比較して搭載効率に優れることが示された。

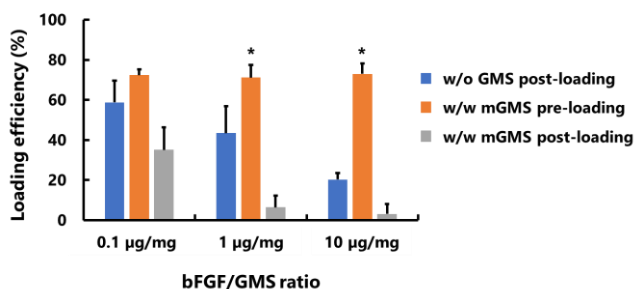


Figure 25. bFGF was efficiently loaded in w/w mGMS by pre-loading. The loading efficiency of bFGF loaded in GMS. Loading efficiency was calculated by measuring the fluorescence intensity of non-loaded fluorescein-labeled bFGF after resuspension of freeze-dried bFGF loading GMS. Results are expressed as the mean \pm SD of four independent experiments. * $P < 0.05$, v.s. other groups.

3.7. bFGF の w/w mGMS と w/o GMS からの放出性の比較

Fluorescein-bFGF の w/w mGMS と w/o GMS からの放出を、蛍光強度を指標に評価した。酵素非存在下において、w/w mGMS からの fluorescein-bFGF の放出は、w/o GMS と比較してわずかに遅延した (Fig. 26A)。コラゲナーゼ存在下において、w/w mGMS からの

fluorescein-bFGF の放出は、w/o GMS と比較して低下した (Fig. 26B)。以上の結果から、w/w mGMS は w/o GMS と比較して徐放性に優れることが示された。

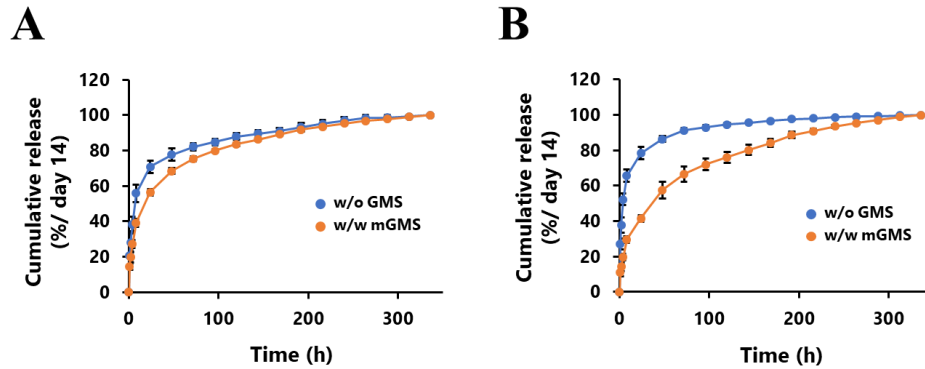


Figure 26. bFGF was more slowly released from w/w mGMS than from w/o GMS. (A,B) Cumulative release of fluorescein-labeled bFGF from w/o GMS or w/w mGMS without (A) or with (B) collagenase I for 14 days. Results are expressed as rate of cumulative release of bFGF with total release of bFGF for 14 days and expressed as the mean \pm SD of four independent experiments.

3.8. w/w mGMS と w/o GMS に搭載した bFGF の生物活性の比較

マウス脂肪由来間葉系幹細胞株 m17.ASC の増殖を指標に、w/w mGMS と w/o GMS に搭載した bFGF の生物活性を WST-8 アッセイにより評価した (Fig. 27A,B)。添加する粒子に含まれる bFGF 濃度は、搭載に用いた bFGF 量を基準に 100 ng/mL とした。bFGF-w/w mGMS は bFGF-w/o mGMS と比較して細胞増殖活性が高かった。これより、プレローディングによって搭載された bFGF の生物活性が保持されていることが示された。また、bFGF を w/w mGMS に搭載することで、生物活性が向上することが示された。

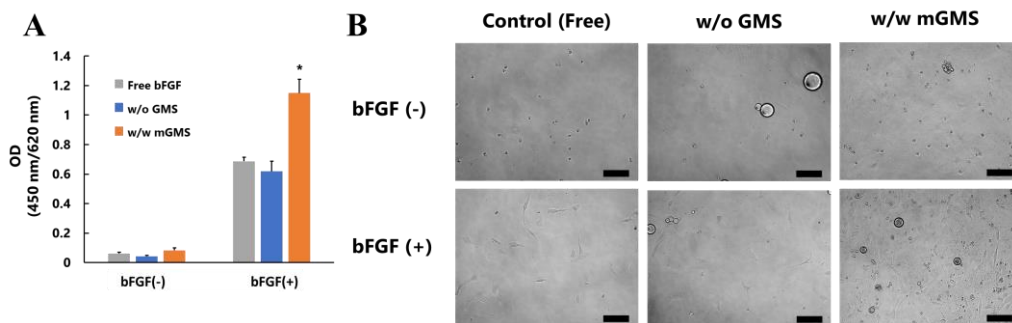


Figure 27. Bioactivity of bFGF increased by pre-loaded in w/w mGMS. (A) The bioactivity of bFGF estimated by measuring the cell number of m17.ASC after culturing with free bFGF or bFGF-loaded GMS. Results are expressed relative to non-treated groups and expressed as the mean \pm SD of four independent experiments. * $P < 0.05$, v.s. other groups. (B) Images of m17.ASC after culturing with or without free bFGF or bFGF-loaded GMS for 3 days.

3.9. bFGF-w/w mGMS の ASC スフェロイドへの内包

マウス腹壁脂肪組織から単離した ASC を用いて bFGF-w/w mGMS を内包した ASC スフェロイドの作製を試みた。ASC 細胞数と bFGF-w/w mGMS 粒子数を 2:1 の比率で混合し、アガロース製のマイクロウェルに播種後、24 時間培養することで細胞スフェロイドを作製した。なお、搭載効率を 100%としたとき、bFGF-w/w mGMS では培養環境中の bFGF 濃度は約 1.5 $\mu\text{g/mL}$ である。bFGF-w/w mGMS を混合した群では、他の群と比較してスフェロイドサイズが増大した (Fig. 28, Table 2)。また、細胞スフェロイドあたりに含まれる DNA 量も増加したことから、細胞スフェロイドあたりの細胞数が増加していることが示唆された。続いて、Lysis buffer を用いて細胞スフェロイドを破壊したところ、w/w mGMS を混合した群でのみ w/w mGMS と考えられる粒子が観察された。また、w/w mGMS を混合した群間で、その粒子量に大きな差は見られなかった。以上より、ASC と bFGF-w/w mGMS を混合しマイクロウェル中で培養することで、bFGF を内包した ASC スフェロイドの作製に成功した。

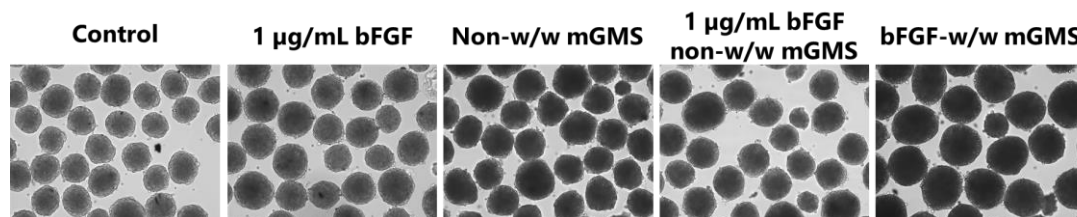


Figure 28. ASC spheroids incorporating bFGF-w/w mGMS was successfully fabricated. Images of ASC spheroids fabricated with free bFGF, non-w/w mGMS or bFGF-w/w mGMS. Scale bar = 100 μm .

Table 2. Properties of ASC spheroids incorporating w/w mGMS.

	Control	1 $\mu\text{g/mL}$ bFGF	Non-w/w mGMS	1 $\mu\text{g/mL}$ bFGF non-w/w mGMS	bFGF-w/w mGMS
Diameter (μm)	206 \pm 28	214 \pm 28	232 \pm 31	225 \pm 33	286 \pm 27
DNA/spheroid (ng)	4.42 \pm 0.53	5.43 \pm 1.01	6.69 \pm 0.44	7.36 \pm 1.57	7.46 \pm 0.70
GMS/spheroid	-	-	1890 \pm 250	2360 \pm 190	2030 \pm 260

Results of the diameter are expressed as the mean \pm SD of one hundred measurements.

Results of DNA/spheroid and GMS/spheroid are expressed as the mean \pm SD of five independent experiments.

3.10. bFGF-w/w mGMS の内包による ASC スフェロイド中の細胞生存率の評価

Live/Dead 染色により ASC スフェロイド内部の細胞生存率を評価した (Fig. 29A)。bFGF-w/w mGMS を内包したスフェロイドでは、細胞スフェロイド内部に死細胞由来の赤色蛍光がほとんど観察されなかった。続いて、WST-8 アッセイを用いて細胞スフェロイド中の生細胞由来の代謝活性を評価した (Fig. 29B)。その結果、bFGF-w/w mGMS では他の群と

比較して吸光度が有意に増大した。以上の結果より、bFGF-w/w mGMS の内包により ASC スフェロイド中の細胞生存率が向上することが示唆された。

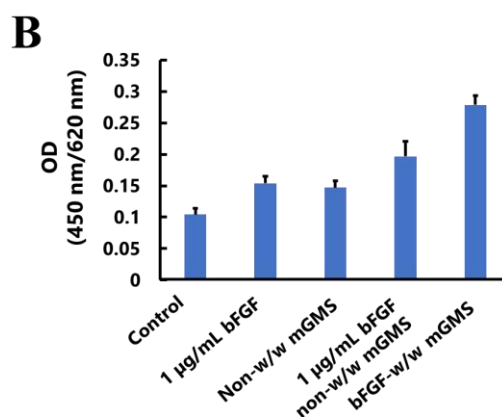
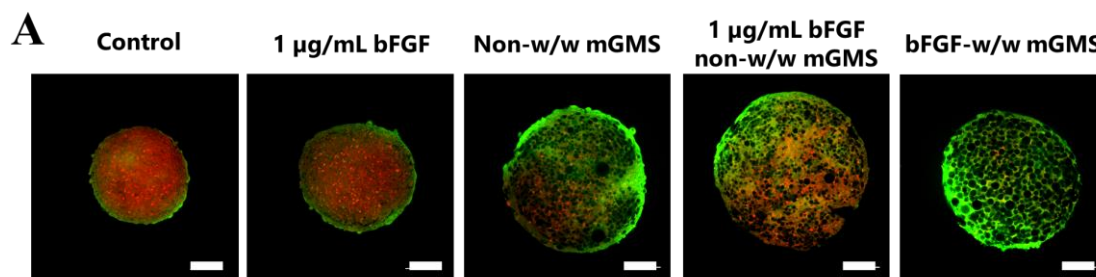


Figure 29. Incorporation of bFGF-w/w mGMS into ASC spheroids increased cell viability. (A) Fluorescence images of ASC spheroids fabricated with free bFGF, non-w/w mGMS or bFGF-w/w mGMS. Live and dead cells were stained with CFSE (green) and PI (red), respectively. Scale bar = 100 µm. (B) The WST-8 metabolization activity of 10 ASC spheroids fabricated with free bFGF, non-w/w mGMS or bFGF-w/w mGMS. Results are expressed as the mean ± SD of four independent experiments.

3.11. bFGF-w/w mGMS の内包による ASC スフェロイドの創傷治療因子発現量評価

ASC は低酸素環境において、HIF1 α の発現増大に伴い創傷治療因子の発現量が向上することが報告されている。そこで、bFGF w/w-mGMS を内包した ASC スフェロイドの HIF-1 α の発現をウェスタンブロッティング法により評価した (Fig. 30A,B)。その結果、bFGF-w/w mGMS を内包した ASC スフェロイドでは、w/w-mGMS を内包しない ASC スフェロイド (コントロール) 群と比較して HIF-1 α の発現量が有意に向上した。次に、創傷治療因子である VEGF、HGF、TGF- β 1 の mRNA 発現量を qRT-PCR により評価した (Fig. 30C-E)。その結果、bFGF-w/w mGMS を内包した ASC スフェロイド中の VEGF、HGF の mRNA 発現量はコントロール群のスフェロイドと比較して有意に増加した。また、TGF- β 1 においても増加する傾向があった。以上の結果より、bFGF-w/w mGMS 内包により ASC スフェロイド中の創傷治療因子の発現量が向上することが示された。

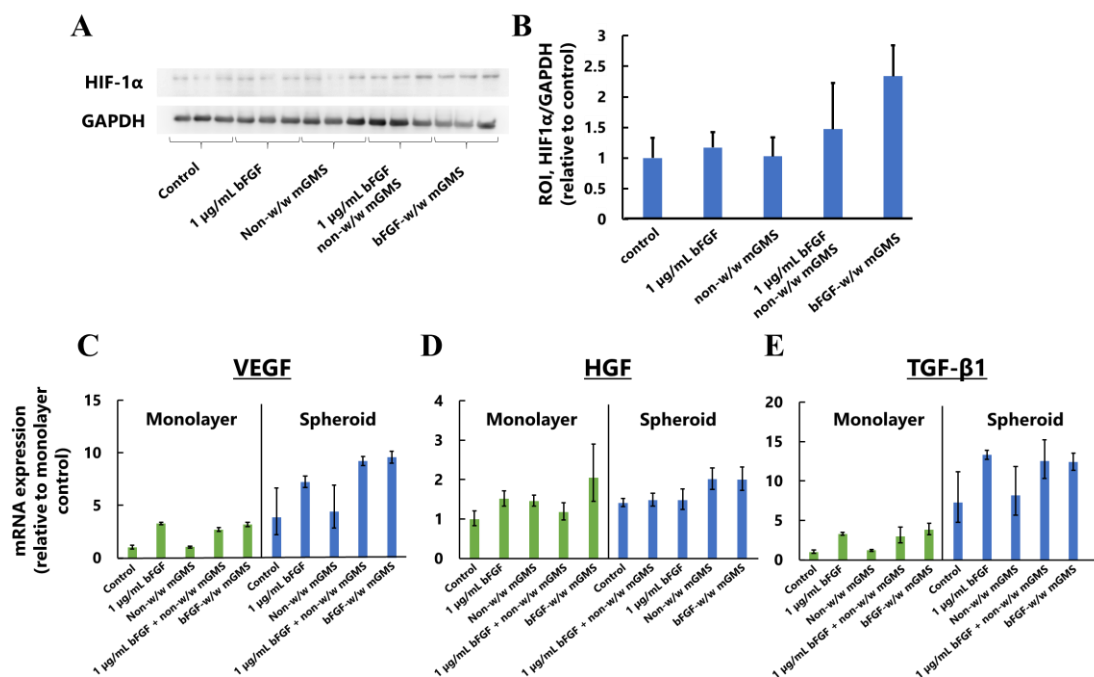


Figure 30. Wound healing factors were highly expressed in ASC cells in spheroids incorporating bFGF-w/w mGMS. (A,B) Western blotting analysis of HIF-1 α in lysates of ASC spheroids fabricated with free bFGF, non-w/w mGMS or bFGF-w/w mGMS. (B) ROI of HIF-1 α expression normalized by that of GAPDH. Results are expressed as the mean \pm SD of three independent experiments. (C-E) The mRNA expression of wound healing factors, (C)VEGF, (D)HGF and (E)TGF- β 1 of ASC spheroids fabricated with free bFGF, non-w/w mGMS or bFGF-w/w mGMS or monolayer-cultured ASC cells with them. The mRNA expression is normalized to that of GAPDH and expressed relative to the monolayer ASC group (control). Result are expressed as the mean \pm SD of three independent experiments.

3.12. bFGF-w/w mGMS を内包した ASC スフェロイドの創傷治療効果の評価

最後に、bFGF-w/w mGMS を内包した ASC スフェロイドの創傷治療効果を評価した。マウス背部に直径 5 mm の生検パンチを用いて創傷を作製し、皮下に bFGF-w/w mGMS を内包した ASC スフェロイドを移植した。また、皮膚の収縮による創傷の癒合を防ぐために傷の周りにドーナツ状のシリコンゴムシート (splint) を接着し、縫い付けた。その後、経時的に創傷部の面積を測定することで、創傷治療効果を評価した (Fig. 31A,B)。bFGF-w/w mGMS を内包した ASC スフェロイドを移植した群においては、他の群と比較して創傷のサイズが小さくなる傾向が見られた。これより、bFGF-w/w mGMS の細胞スフェロイドへの内包により ASC スフェロイドの治療効果が増大することが示唆された。

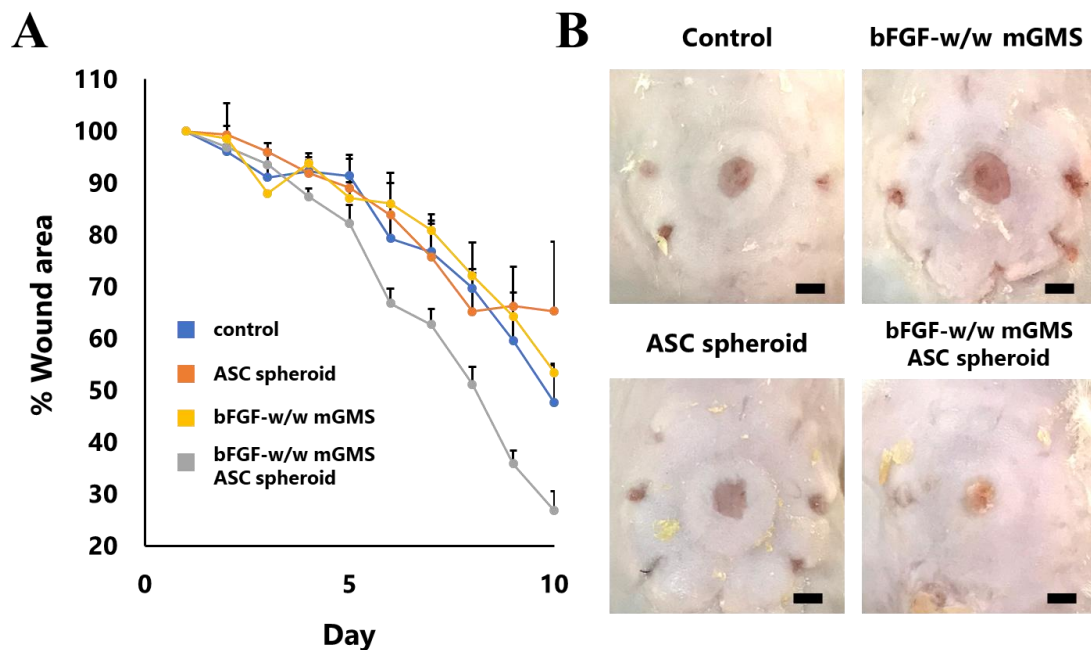


Figure 31. ASC spheroids incorporating bFGF-w/w mGMS effectively repaired wound. (A) Wound closure ratio after subcutaneous transplantation of 200 ASC spheroids incorporating bFGF-w/w mGMS or not or injection of 4×10^5 bFGF-w/w mGMS. Results are expressed as the mean \pm SE of three independent experiments. (B) Images of the wound area 10 days after transplantation. Scale bar = 5 mm

3.13. 考察

MSC は移植部位で、免疫調節作用、血管新生促進作用、抗アポトーシス作用、抗酸化作用、組織幹細胞の活性化作用を發揮することから、様々な疾患に対する治療効果が期待されている⁷⁶⁻⁷⁹。しかしながら、通常低酸素ニッチ (1-5% O₂) な環境に存在するため、定常酸素濃度 (20-21% O₂) 環境での培養では、細胞増殖や分化、抗免疫反応、組織修復作用が低下することが報告されている^{80,81}。また、移植後においても、足場依存的な細胞死 (アノイキス) や炎症が生じる厳しい環境では、機能の低下や細胞死により治療効果が奏功しないことが報告されている^{82,83}。そのため、*in vitro* および *in vivo* の両面で間葉系幹細胞を機能的に利用するための細胞移植システムが必要である。近年、これらの問題を解決するために培養環境の最適化や、薬物を用いた前処理が報告されている⁶⁴。MSC をあらかじめ低酸素環境で培養することや、サイトカインなどの薬物を用いて前処理することにより、移植後の厳しい環境下においても生存シグナルにより、生着率が向上することが報告されている^{68-70,84}。しかしながら、これらのアプローチは移植前の細胞に対する処理でありことから、移植後においては、効果が失われていくことが考えられる。そのため、移植後においても MSC の機能を十分に發揮させるシステムが必要であると考えられる。

細胞スフェロイド中で細胞は、第二章で述べたとおり低酸素環境にさらされる。MSC ス

フェロイドにおいては、他の細胞とは異なり低酸素環境がより MSC を活性化していることが考えられる。また、細胞のスフェロイド化の移植への応用においては、細胞培養環境中の細胞間相互作用が移植後においても維持されることから、MSC の活性を細胞移植前後で維持可能な優れた方法であると考えられる。一方で、細胞スフェロイドでは、細胞が密に凝集しているため、内部への薬物の透過性が低いことから、薬物による前処理は困難である。本研究では、細胞スフェロイド内部にあらかじめ薬物を搭載したゼラチン微粒子を内包することに成功した。本方法では、既存の細胞スフェロイドでは困難であった、細胞スフェロイド内部への薬物の送達が可能である。また、第二章において w/o GMS をスフェロイドに内包した際には低酸素環境の改善が見られた一方で、新規に作成した w/w mGMS の内包においては、細胞スフェロイド内部の HIF-1 α 活性が上昇していたため、低酸素環境がより強くなったと考えられる。そして、MSC を活性化する薬物を搭載した粒子を内包した状態で細胞スフェロイドを移植することから、移植後の MSC の活性化も期待できる。以上のことから本研究で得られた成果は、従来法では困難であった問題を解決し、MSC の機能を最大限に活かす革新的な方法になりうると考えられる。

これまでも w/o GMS は、ドラッグキャリアへの応用例が報告されている^{51,52}。これらは、ゼラチンが精製過程における処理方法により電荷の制御が可能であり、静電的相互作用を利用したドラッグキャリアとなるからである。特に、増殖因子などのタンパク質を搭載した w/o GMS は再生医療分野への応用が期待されている^{61,62}。しかしながら、w/o GMS はその作製過程において、乳化時の有機溶媒の使用や、ゾル化する融点以上の加熱処理、w/o GMS を安定化するための架橋反応においてタンパク質の失活過程を含むことから、ゼラチン微粒子へのタンパク質の搭載は、静電的相互作用を利用した粒子作製後のポストローディングに限られる。同方法においては、薬剤の搭載が粒子の表面に限られるため、その搭載量には限界がある。また、ゼラチンからの薬物の放出は、ゼラチンの分解が律速過程であるが、その分解も粒子の表面から起こるため、長期の放出は期待できない。本研究で開発した、w/w mGMS では作製過程にタンパク質の変性過程を含まないため、タンパク質のプレローディングが可能である。プレローディングとポストローディングを比較した際、ポストローディングでは搭載量の増加に伴う搭載効率の低下が見られた一方で、プレローディングでは搭載効率に変化がなかった。この結果は、プレローディングにおける搭載効率の決定因子が、粒子表面積ではなく、w/w エマルション作製時の PEG 相とゼラチン相間の分配によるためと考えられる。また、水性二相分離法における分散相への配向性は、相形成分子への相互作用、モル濃度、およびポリマーの重合度が関与する⁷⁴。そのため、これらの条件を最適化することでさらに搭載効率を向上可能であると考えられる。そして、プレローディングにおいては静電的相互作用を介さないため、電荷の有無によらない薬剤の搭載が可能である。予備検討では、負電荷の電荷をもつタイプ B ゼラチンを用いた w/w mGMS に負電荷のアルブミンを搭載することに成功している。また、徐放性も従来の GMS と比較して向上した。w/w mGMS からの bFGF の放出は w/o GMS と同様に GMS の分解が

律速過程であると考えられる。w/w mGMS では、w/o GMS と比較して安定性が向上しているとともに、薬物が粒子表面に局在しないことから徐放性が向上したと考えられる。しかし、本研究で作製した w/w mGMS は、コラゲナーゼ存在下でも完全に分解しなかったことから、薬物の放出が不十分であることや、投与後の安全性に懸念がある。メタクリル基を介した架橋は、ゼラチンへのメタクリル基の導入量により調節可能である⁸⁵ ことから、メタクリル基の導入を最適化することによって、より優れた w/w mGMS を作製可能であるとともに、徐放性も調節できると考えられる。以上より、本研究で開発した、w/w mGMS を用いた薬物のプレローディング法は、従来の w/o GMS を用いたポストローディング法における問題を克服した優れた方法であると考えられる。

細胞治療では、細胞機能および生着率が治療効果を決定する。本研究で作製した bFGF-w/w GMS を内包した ASC スフェロイドでは、移植前における生細胞数および細胞機能が向上した。フリーの bFGF の添加群および非搭載の w/w mGMS の内包群においてもコントロール群と比較して ASC スフェロイド中の細胞数の指標となる DNA 量が増加したことから、この両アプローチがそれぞれ細胞スフェロイド中の細胞増殖を活性化したと考えられる。また、bFGF-w/w mGMS 内包群をフリーの bFGF+非搭載の w/w mGMS 内包群と比較したとき DNA 量が同等である一方で、WST-8 代謝活性が高い傾向が見られた。これは、細胞スフェロイド中の生存率を反映している結果であり、bFGF のスフェロイド内部への送達で内部の細胞の生存率を維持した結果であると考えられる。また、細胞機能についても、細胞スフェロイド化および bFGF の添加により創傷治療因子である VEGF、HGF、TGF- β 1 の発現上昇が見られた。一方で、ASC スフェロイドへの w/w mGMS の内包のみでは細胞機能にはほとんど影響が見られなかった。ASC の細胞スフェロイド化による創傷治療因子の発現向上は、細胞スフェロイド内部の低酸素環境下に応答して HIF-1 α の発現量が向上したことによるものと考えられる。また、単層培養群で bFGF の添加により創傷治療因子の発現が向上したことから、bFGF 自体も創傷治療因子の発現に影響していると考えられる。

また、bFGF-w/w mGMS の細胞スフェロイドへの内包は HIF-1 α の発現量を増加させた。この結果は、第二章第二節における w/o GMS の内包により細胞スフェロイド内部の低酸素環境が改善した結果や、骨前駆細胞株 MC3T3-E1 スフェロイドにおいて w/o GMS の内包により低酸素環境が改善する報告⁵⁸に反する。この原因は、w/w mGMS と w/o GMS の構造の違いにあると考えられる。w/o GMS はハイドロゲル粒子であることが報告されている。そのため SEM 写真でも多数のひだを観察された。一方で、w/w mGMS では表面にひだはなく、しっかりとした構造が観察された。また、w/w mGMS は w/o GMS と比較して含水率や膨潤率が低かった。これらの結果から、w/w mGMS は w/o GMS と比較してポリマーが密につまった構造であり、網目構造中の空隙が小さく、酸素の透過性が低いことが考えられる。また、bFGF による細胞数の増加および細胞増殖活性の向上が、局所的な酸素の消費量を向上していることも考えられる。これらの結果から、酸素濃度の低下にともない HIF-1 α の発現が上昇したと考えられる。前述の通り MSC における低酸素環境処理は、細胞機能を活性化する

ため、ASC スフェロイドへの w/w mGMS の内包は w/o GMS の内包と比較して有利である。以上より、bFGF-w/w mGMS の ASC スフェロイドへの内包は細胞生存率、細胞機能を向上させる優れた方法であると考えられる。

創傷治療において、bFGF-w/w mGMS 内包 ASC スフェロイドはコントロールの ASC スフェロイドと比較して高い治療効果を示した。前述の通り、コントロールの ASC スフェロイドと比較して、細胞生存率、細胞機能に優れているため、生着率が向上するとともに細胞機能が維持されたためと考えられる。しかし、投与後の細胞挙動については不明点が多いため、さらなる検証が必要である。

以上、第三章では、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'-GCAACGCATATCTGGAACTTG-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。

第二章第一節 実験の部

【1】試薬

過酸化カルシウム、collagenase (Clostridium histryticum 由来) は、Sigma Aldrich 社より購入した。MAR (低酸素応答性プローブ) は、五稜化薬株式会社より購入した。Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) は日水製薬株式会社より購入した。他の試薬は第一章と同様のもの、もしくは市販の特級品を用いた。

【2】細胞株

マウスメラノーマ細胞株 B16-BL6 は、理研バイオリソースセンター社から購入した。B16-BL6 細胞は10 v/v% FBS、0.2 w/v% 炭酸水素ナトリウム、PSG、2 g/L glucose を添加したDMEMで培養した。HepG2、MIN6 は第一章と同様の方法で培養した。

【3】実験動物

6週齢のICR系雄性マウスを日本SLC株式会社より購入し、コンベンショナル環境下で標準餌と水を与えて飼育した。すべての動物実験は、京都大学大学院薬学研究科の動物実験委員会の承認を得て行った。

【4】マウス脂肪由来間葉系幹細胞 (ASC) の初代培養

ICR マウス (6週齢、雄) より、腹壁脂肪組織を単離し、1 mg/mL collagenase 含有 HBSS 中にて1 mm 程度の組織片に裁断した。1時間半 37 °Cで酵素処理したのちに、100 μm フィルターを通した細胞群を HBSS にて洗浄し、RBC lysis buffer (155 mM NH₄Cl、10 mM KHCO₃、0.1 mM EDTA) にて赤血球を除去した。遠心により、細胞を回収したのち、20 v/v% FBS、0.2 w/v% 炭酸水素ナトリウム、PSG を添加した DMEM で培養した。24時間後に非接着細胞を取り除き、その72時間後に0.25 w/v% trypsin-EDTA 溶液を用いて回収した細胞群を ASC

として実験に用いた。

【5】 過酸化カルシウムを混合した PDMS からの酸素生成の測定

PDMS と硬化用触媒の混合物 (10:1) に対して、質量比で 5、15、25 w/w% となるように過酸化カルシウムを混合し、ファルコンチューブに 1 g ずつ分注した。60 °C、2 時間の処理によりファルコンチューブ内で硬化した。注射用水を 5 mL 積層し、1、2、4、6、8、12、24、48、72 時間後の水中の酸素濃度を溶存酸素計 (マルチメータ HQ30d) により測定した。また、24、48 時間後の計測後に注射用水を取り換えた。

【6】 酸素生成マイクロウェルの作製

PDMS 製マイクロウェルは、第一章と同様の方法で作製した。酸素生成マイクロウェルは、PDMS と硬化用触媒の混合物に対して、質量比で 5、15、25 w/w% となるように過酸化カルシウムを混合し、その後は PDMS 製マイクロウェルと同様の方法で作製した。

【7】 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-EDTA 溶液を用いて回収した。回収した細胞を 5.0×10^6 cells/3 mL で培地に調製した。続いて、調製した細胞懸濁液を 3 mL マイクロウェル基板を設置した 6 ウェルプレートに播種し、 5.0×10^6 cells/well の濃度で 72 時間、37 °C、5 % CO₂、加湿条件下で培養した。

【8】 細胞スフェロイドのサイズ、細胞数の測定

作製した細胞スフェロイドを、顕微鏡 (BZ-X710) 下で観察した。得られた写真より細胞スフェロイドの面積を測定し、円と仮定したときの直径を算出した。また、細胞スフェロイドを PBS 20 μ L 中に 20 個回収し、80 μ L の 0.25 w/v% trypsin-EDTA 溶液を加え、37 °C、10 分処理することでスフェロイドを破壊し、得られた細胞懸濁液からトリパンブルー色素排除を指標に細胞スフェロイドあたりの生細胞数を測定した。

【9】 Live/Dead 染色

作製した細胞スフェロイドを、PBS にて一度洗浄した。10 μ M CFSE と 5 μ g/mL propidium iodide (PI) を溶解した Opti-MEM で 30 分、37 °C で処理することでそれぞれ生細胞と死細胞を染色した。Live/Dead 染色した細胞スフェロイドは、第一章と同様の方法で固定、透明化を行い共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

【10】 HepG2 培養環境中の酸素濃度の測定

前述の細胞スフェロイド作製法に従い、酸素生成マイクロウェル中に HepG2 を播種し、24、48、72 時間後に培地を回収し、培地中の酸素濃度を溶存酸素計により測定した。

【11】 HepG2 スフェロイド中の低酸素環境の評価

酸素生成マイクロウェルに HepG2 を播種し、1、48 時間後に 1 μ M MAR 含有培地に培地を交換した。24 時間後に得られた細胞スフェロイドを、0.25 w/v% trypsin-EDTA 溶液により破壊し、得られた細胞懸濁液を用いてフローサイトメトリー法により、細胞中の MAR 由来の蛍光強度を測定した。

【12】 統計学的解析

統計学的解析は第一章と同様の方法により行った。

第二章第二節 実験の部

【1】 試薬

NHS-Rhodamine は、Thermo Fisher Scientific 社から購入した。Span 60 と tween 60 はナカライテスク社より購入した。Gelatin (type-b, bovine bone derived) と agarose は和光純薬株式会社から購入した。他の試薬は第一章、第二章第一節と同様のもの、もしくは市販の特級品を用いた。

【2】 細胞株

HepG2 については、第一章と同様の方法で実験に用いた。

【3】 GMS の作製

GMS は過去の報告を一部改変し作製した⁵³。60 °Cに温めた 4 mL の 10 w/w% ゼラチン水溶液を 120 mL の 0.1 w/v% の span 60 を溶解したオリーブオイルに滴下した。続いてスターラーを用いて 1000 r.p.m.、60 °Cで 1 時間攪拌し、W/O エマルジョンを作製した。氷上にて 4 °Cまで冷やし、ゼラチンを含むエマルジョンをハイドロゲル化し、微粒子を作製した。続いて、4 °Cのアセトンに懸濁し遠心 (3,300 \times g、4 °C、5 min) することで 3 回洗浄を行った。風乾によりアセトンを取り除いたのちに、4°C条件下で 0.05 w/v% の glutaraldehyde と 0.1 w/v% の tween 60 を溶解した水溶液 40 mL で 24 時間懸濁し化学架橋を行った。架橋反応後、glycine 40 mg を添加して、3 時間懸濁することで未反応のアルデヒド基をブロックした。最後に GMS を蒸留水で 3 回洗浄し、凍結乾燥することで GMS を得た。凍結乾燥した GMS は、走査型顕微鏡 (S-4700) により観察した。また、注射用水に懸濁した GMS は、顕微鏡 (BZ-X710) を用いて観察した。得られた写真から粒子径を測定した。

【4】 GMS の毒性評価

HepG2 1×10^4 個と 1、2、5、 10×10^3 個の GMS を混合し 96 ウェルプレート中に 100 μ L ず

つ播種した。24 時間後の生細胞数を Cell Count Reagent SF (ナカライテスク社) を用いて WST-8 アッセイすることにより測定し、これを指標に GMS の細胞毒性を評価した。

【5】アガロース製マイクロウェルの作製

直径と高さが均一に 600 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。加熱により 3 w/v% agarose を溶解した PBS 上にマイクロウェルの鋳型を静置し、30 分間 20-25 $^{\circ}\text{C}$ で静置することでアガロース溶液をゲル化させた。以降は第一章の PDMS 製マイクロウェルと同様の方法によりアガロース製マイクロウェルを作製した。作製したマイクロウェルは、高さが $523 \pm 15 \mu\text{m}$ 、中間直径が $539 \pm 42 \mu\text{m}$ 、最大直径が $910 \pm 55 \mu\text{m}$ であった。

【6】HepG2/GMS スフェロイドの作製

凍結乾燥した GMS に紫外線 (253.7 nm) を 1 時間照射することで GMS を滅菌した。 2.5×10^6 個の HepG2 とそれぞれ 5、12.5、25、 50×10^4 個の GMS を混合し 3 mL の培地に調製した。続いて、調製した細胞懸濁液を 3 mL マイクロウェル基板を設置した 6 ウェルプレートに 3 mL 播種し、 2.5×10^6 cells/well の濃度で 72 時間、37 $^{\circ}\text{C}$ 、5 % CO_2 、加湿条件下で培養した。

【7】HepG2/GMS スフェロイドの作製

細胞スフェロイドのサイズと細胞数の測定は第二章第一節と同様の方法で行った。

【8】共焦点レーザー顕微鏡観察

HepG2 の CFSE 標識は第一章と同様の方法で行った。GMS は、37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下で 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の NHS-Rhodamine を溶解した 20 mM HEPES 溶液中に 15 分間懸濁することで rhodamine 標識を行った。CFSE 標識 HepG2 と rhodamine 標識 GMS を用いて、前述の方法に従い蛍光標識 HepG2/GMS スフェロイドを作製した。続いて、第一章と同様の方法で固定、透明化を行い、共焦点レーザー顕微鏡を用いて蛍光標識 HepG2/GMS スフェロイドを観察した。

【9】HepG2/GMS スフェロイド中の低酸素環境の評価

作製した 100 個の HepG2/GMS スフェロイドを 6 ウェルプレートに播種し、1 μM MAR を溶解した培地中で 6 時間培養した。MAR 処理後の細胞スフェロイドを第二章第一節と同様の方法で破壊し、細胞中の MAR 由来の蛍光強度をフローサイトメトリー法にて測定した。

【9】Live/Dead 染色

第二章第一節と同様の方法で、Live/Dead 染色を行い観察した。

【9】EROD assay

先行文献⁵⁴に従い、HepG2のCYP1A1代謝活性をERODアッセイにて評価した。懸濁状態の 1×10^5 個のHepG2、もしくは20個のHepG2/GMSスフェロイド(約 1×10^5 個の細胞数相当)を $2 \mu\text{M}$ の7-ethoxyresorufinを含むEROD反応バッファー(50 mM Na_2HPO_4 を50 mM NaH_2PO_4 を用いてpH8.0に調製した緩衝液)で24ウェルプレート中に播種した。37°C条件下で1時間培養後、上清中の7-ethoxyresorufin代謝物由来の蛍光強度を、FluoroMax-4分光蛍光高度計(HORIBA Scientific社)によって測定した。

【10】qRT-PCR法

第一章と同様の方法で、mRNAの抽出、逆転写、およびリアルタイムPCRを行った。用いたプライマーは以下の通りである。CYP1A1: forward (5'-TCCAGAGACAACAGGTAAAACA-3')、reverse (5'-AGGAAGGGCAGAGGAATGTGAT-3')。β-actin: forward (5'-GCCATGCCAATCTCATCTTG-3')、reverse (5'-AGGAAGGGCAGAGGAATGTGAT-3')。

【11】統計学的解析

統計学的解析は第一章と同様の方法により行った。

第三章 実験の部

【1】試薬

Methacrylic anhydride と 2-hydroxy-4'-(2-hydroxyethoxy)-2-methylpropiophenone (Irgacure2959) と blue dextran は Sigma-Aldrich 社から購入した。NHS-Fluorescein は Thermo Fisher Scientific 社より購入した。ポリエチレングリコール 6,000 (PEG) は和光純薬株式会社から購入した。Protease inhibitor cocktail は、ナカライテスク社より購入した。Glutathione sepharose™ 4B は GE ヘルスケアライフサイエンス社から購入した。他の試薬は第一章、第二章と同様のもの、もしくは市販の特級品を用いた。

【2】細胞株

マウス脂肪由来間葉系幹細胞株 m17.ASC は、東京理科大学薬学部西川元也教授より供与していただいた。m17.ASC は非働化した 20 v/v% FBS、0.2 w/v% 炭酸水素ナトリウム、PSG を添加した DMEM 培地で培養した。

【3】実験動物

6-8 週齢の BALB/c 系雄性マウスを日本 SLC 株式会社より購入し、コンベンショナル環境下で標準餌と水を与えて飼育した。すべての動物実験は、京都大学大学院薬学研究科の動物実験委員会の承認を得て行った。

【4】ASCの初代培養

BALB/c マウス（6-8 週齢、雄）より、第二章第一節と同様の方法で ASC の単離、および培養を行った。

【5】GMA の合成

60 °C に加温しながら 25 g の gelatin を 200 mL の PBS 中に溶解した。12.5 mL の methacrylic anhydride をゼラチン溶液に滴下し、4 N NaOH を用いて pH を 7.0~7.4 に維持しながら 2 時間反応させた。反応後に得られた溶液を、1 日おきに蒸留水を取りかえながら 5 日間透析した。透析後、凍結乾燥により GMA を得た。30 w/w% GMA 水溶液に 0.05 w/v% irgacure2959 を溶解し、3UV™ Transilluminator を用いて 10 分間紫外線 (UV-A) を照射した。その後、0.1 w/v% blue dextran 溶液を積層することでゲル化を確認した。Fluorescamine アッセイにてゼラチンへのメタクリル酸の修飾率を測定した。300 μL の未修飾ゼラチンまたは GMA 水溶液と、100 μL の 3 mg/mL の fluorescamine を溶解した DMSO 溶液を混合した。15 分 20-25 °C で反応後、FluoroMax-4 分光蛍光高度計を用いてサンプルの蛍光強度 (ex.365/em.470) を測定した。スタンダードには Glycine 水溶液を用いた。

【6】GMS の作製

PBS に 40 w/w% の PEG、20 w/w% の GMA、5 mg/mL の Irgacure2959 を溶かした溶液を用意し、PEG と GMA を混合した乳濁液に、Irgacure2959 が終濃度で 0.5 mg/mL となるように添加し 1000 r.p.m. で 10 分間乳濁することで W/W エマルジョンを作製した。乳濁液に 3UV™ Transilluminator を用いて 10 分間紫外線 (UV-A) を照射することで架橋を行い、遠心 (300×g、5 分) により 3 回洗浄することで w/w mGMS を作製した。また、w/o GMS は、第二章第二節と同様の方法により作製した。顕微鏡観察により得られた写真から粒子径を測定した。作製した GMS は凍結乾燥後に bca protein assay kit を用いてタンパク質量を測定し、収率を算出した。また、凍結乾燥した w/w mGMS を走査型電子顕微鏡により観察した。膨潤率と含水率は、200 μL の 10 mg/mL GMS 懸濁液を遠心 (300×g、5 分) し、上清を取り除いた後の重量 (swollen GMS weight, W_s) と同サンプルの凍結乾燥後の重量 (dry GMS weight, W_d) から以下の式を用いて算出した。

$$\text{Swelling ratio (q)} = \frac{(W_s)}{(W_d)}$$

$$\text{Water content} = \frac{(W_s - W_d)}{(W_s)} \times 100$$

【7】w/w mGMS の蛍光標識

10 mL の 1 w/w% GMA 含有 PBS に 52.8 μL の 10 mg/mL NHS-Rhodamine 含有 DMSO を滴下し、20-25 °C で 1 時間インキュベートした。4 日間の透析後、凍結乾燥により rhodamine 標識 GMA を得た。終濃度で 30 w/w% の PEG、1.98 w/w% の GMA、0.02 w/w% の rhodamine

標識 GMA、0.5 mg/mL の irgacure2959 となるように W/W エマルジョンを調製することで w/w mGMS を作製した。作製した w/w mGMS は、BZ-X710 により蛍光観察した。

【8】 GMS の安定性評価

1 mg の GMS を 1 mL の 2 mM CaCl₂ 含有 PBS、または 10 µg/mL collagenase、2 mM CaCl₂ 含有 PBS に懸濁した。経時ごとに遠心 (300×g、5 分) し、上清を 300 µL 回収後に新たに 300 µL の溶液を加えた。上記の操作を 14 日間行ったのちに上清中の分解物量を bca protein assay により測定した。

【9】 bFGF の精製

Sino Biological 社より Mouse bFGF Gene cDNA clone plasmid を購入した。bFGF cDNA 配列を pGEX-6P-2 プラスミドに組み替えた。作製したプラスミドを BL21(DE3)pLysS に形質転換し、1 L の 100 µg/mL ampicillin 含有 LB 培地で O.D. 600 nm が 0.5 になるまで培養した。Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside を終濃度で 0.5 mM となるように添加し、30 °C で 4 時間培養した。培養液を遠心 (3000×g、15 分、4 °C) 後、ソニケーションバッファー (50 mM Tris-HCl, pH7.5、150 mM NaCl、10 mM DTT、protein inhibitor cocktail) で懸濁し、超音波処理により大腸菌からタンパク質を抽出した。Glutathione sepharose™ 4B を用いて抽出液中の bFGF を精製した。精製した bFGF のタンパク質量は bca protein assay により測定した。

【10】 bFGF の蛍光標識

精製後の bFGF を 10K フィルターの限外ろ過により PBS に置換した。1 mL の 1 mg/mL bFGF 溶液に 41.8 µL の 10 mg/mL NHS-Fluorescein を加え、4 °C で 24 時間反応した。10K フィルターの限外ろ過により fluorescein 標識 bFGF を精製した。

【11】 bFGF の搭載

bFGF を含む GMA 溶液を用いて、w/w mGMS を作製することで bFGF のプレローディングを行った。搭載後、凍結乾燥を行い、使用時まで -80 °C で保存した。1 mg の w/w GMS または w/o GMS に 10 µL の bFGF 溶液を添加し、凍結乾燥を行うことでポストローディングを行った。凍結乾燥した GMS を再懸濁し、遠心 (300×g、5 分) 後、上清中の fluorescein 標識 bFGF 由来の蛍光強度を測定することで、搭載効率を評価した。

【12】 GMS からの bFGF 徐放性評価

5 µg/mg で fluorescein 標識 bFGF を搭載し、凍結乾燥した w/w mGMS と w/o GMS を 1 mg ずつエッペンに用意した。3 回洗浄後、1 mL の 2 mM CaCl₂ 含有 PBS、または 10 µg/mL collagenase、2 mM CaCl₂ 含有 PBS に懸濁し 37 °C 条件で静置した。14 日間経時ごとに遠心

(300×g、5分)し、上清を全量回収したのちに、新たに1 mLの反応液で再懸濁した。上清中の fluorescein 標識 bFGF 由来の蛍光強度を測定することで、bFGFの放出量を算出した。

【13】 bFGFの生物活性評価

96 ウェルプレート中に 3×10^3 個の m17.ASC 細胞を播種し、bFGF 換算量計 10 ng を搭載した GMS/100 μ L または 100 ng/mL bFGF を含有する FBS (-) DMEM 100 μ L で培養した。72 時間後、WST-8 アッセイにて m17.ASC の細胞数を指標に細胞増殖活性を評価した。

【14】 w/w mGMS 内包 ASC スフェロイドの作製

2.5×10^6 個の ASC と 1.25×10^6 個の w/w mGMS を混合し、第二章第二節と同様の方法で w/w mGMS 内包 ASC スフェロイドを作製し、培養 24 時間後のスフェロイドを回収した。スフェロイドサイズは第二章と同様の方法で評価した。エッペンに 10 個の細胞スフェロイドを回収、凍結したのち CyQUANT Cell Proliferation (Thermo Fisher Scientific 社) を用いて DNA 量を定量した。Lysis buffer により細胞スフェロイドを破壊し、血球計数盤を用いて細胞スフェロイドあたりの細胞数を測定した。

【15】 Live/Dead アッセイ

第二章第一節と同様の方法で、Live/Dead 染色を行い観察した。

【16】 HIF-1 α の Western blotting

RIPA buffer (50 mM Tris-HCl pH8.0、150 mM NaCl、0.5 w/v% sodium deoxycholate、0.1 w/v% sodium dodecyl sulfate、1.0 w/v% NP-40 substitute) により調製した細胞スフェロイド溶解液を 0.1 M dithiothreitol で処理後、95 °C で 3 分間加熱した。その後、10 % ポリアクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE により 200V で 1 時間電気泳動を行った。さらに、ゲルを回収し電気泳動により PVDF 膜にタンパク質を転写した。得られた PVDF 膜は Blocking One (ナカライテスク社) で 30 分振とうした後に、rabbit anti-HIF-1 alpha 抗体 (ERP16897, abcam 社, 1:1000) もしくは、mouse anti-GAPDH 抗体 (6C5, abcam 社, 1:5000) で 20-25 °C で 1 時間処理した。その後 0.1 w/v% tween 20 含有 TBS (250 mM Tris-HCl pH7.4、1.5 M NaCl) で洗浄し、goat anti-rabbit IgG-HRP 抗体 (sc-2054, Santa Cruz Biotechnology 社, 1:5000) または、Goat anti-mouse IgG1 HRP 抗体 (A90-105P, BETHYL 社, 1:10000) で 20-25 °C で 1 時間処理した。洗浄後、Immobilion Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore 社) で処理し、LAS-3000 imaging system (FUJIFILM 社) によりバンドを検出した。

【17】 qRT-PCR 法

第一章と同様の方法で、mRNA の抽出、逆転写、およびリアルタイム PCR を行った。用いたプライマーは以下の通りである。標的遺伝子の mRNA 発現に対する相対定量時の標準と

して、GAPDH を用いた。VEGF: forward (5'-CATCTTCAAGCCGTCCTGTGT-3')、reverse (5'-CAGGGCTTCATCGTTACAGCA-3')。HGF: forward (5'-TCATTGGTAAAGGAGGCAGCTATA-3')、reverse (5'-CTGGCATTGATGCCACTCTTA-3')。TGFB1: forward (5'-TTGCTTCAGCTCCACAGAGA-3')、reverse (5'-TGGTTGTAGAGGGCAAGGAC-3')。GAPDH: forward (5'-AGGTCGGTGTGAACGGATTTG-3')、reverse (5'-TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA-3')。

【18】創傷モデルマウスへの細胞移植

創傷モデルマウスは過去の報告に従って作製した⁸⁸。8週齢のBalb/c系マウスは、イソフルラン麻酔下で電気バリカンを用いて背部を除毛した。生検パンチ（カイインダストリーズ社）を用いて背部に直径5mmの全層欠損皮膚創傷を作製した。創傷部位を囲むようにドーナツ型のシリコンシートをアロンアルファ（第一三共株式会社）により接着後、縫合した。創傷部位から皮下に200個のASC細胞スフェロイド、または 4×10^5 個のbFGF-w/w mGMSを投与した。テガダーム（3M社）により創傷部を被覆し、経時ごとに創傷部位の写真を撮影し、画像解析ソフトImage Jを用いて創傷部の面積を測定した。

【19】統計学的解析

統計学的解析は第一章と同様の方法により行った。

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. W. Piao, S. Tsuda, Y. Tanaka, S. Maeda, F. Liu, S. Takahashi, Y. Kushida, T. Komatsu, T. Ueno, T. Terai, T. Nakazawa, M. Uchiyama, K. Morokuma, T. Nagano, K. Hanaoka: Development of azo-based fluorescent probes to detect different levels of hypoxia. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **52** 13028–13032 (2013)
 44. Farris AL, Rindone AN, Grayson WL. Oxygen delivering biomaterials for tissue engineering. *J*

- Mater Chem B.* **4** 3422-3432 (2016)
45. Gholipourmalekabadi M, Zhao S, Harrison BS, Mozafari M, Seifalian AM. Oxygen-generating biomaterials: a new, viable paradigm for tissue engineering? *Trends Biotechnol.* **34** 1010-1021 (2016)
 46. Lunt SY, Vander Heiden MG: Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation. *Annu Rev Cell Dev Biol.* **27** 441-64 (2011)
 47. Kudryavtseva AV, Krasnov GS, Dmitriev AA, Alekseev BY, Kardymon OL, Sadritdinova AF, Fedorova MS, Pokrovsky AV, Melnikova NV, Kaprin AD, Moskalev AA, Snezhkina AV: Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in aging and cancer. *Oncotarget.* **7** 44879-44905 (2016)
 48. Oliveira MB, Mano JF. Polymer-based microparticles in tissue engineering and regenerative medicine. *Biotechnol Prog.* **27** 897-912 (2011)
 49. Ahrens CC, Dong Z, Li W: Engineering cell aggregates through incorporated polymeric microparticles. *Acta Biomater.* **62** 64-81 (2017)
 50. Echave MC, Saenz del Burgo L, Pedraz JL, Orive G: Gelatin as biomaterial for tissue engineering. *Curr Pharm Des.* **23** 3567-3584 (2017)
 51. 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)
 52. 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)
 53. Gunji S, Obama K, Matsui M, Tabata Y, Sakai Y: A novel drug delivery system of intraperitoneal chemotherapy for peritoneal carcinomatosis using gelatin microspheres incorporating cisplatin. *Surgery.* **154** 991-9 (2013)
 54. Petrusis JR, Chen G, Benn S, LaMarre J, Bunce NJ: Application of the ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) assay to mixtures of halogenated aromatic compounds. *Environ Toxicol.* **16** 177-84 (2001)
 55. Yip D, Cho CH: A multicellular 3D heterospheroid model of liver tumor and stromal cells in collagen gel for anti-cancer drug testing. *Biochem Biophys Res Commun.* **433** 327-32 (2013)
 56. Brancato V, Garziano A, Gioiella F, Urciuolo F, Imparato G, Panzetta V, Fusco S, Netti PA: 3D is not enough: Building up a cell instructive microenvironment for tumoral stroma microtissues. *Acta Biomater.* **47** 1-13 (2017)
 57. Bratt-Leal AM, Carpenedo RL, Ungrin MD, Zandstra PW, McDevitt TC. Incorporation of biomaterials in multicellular aggregates modulates pluripotent stem cell differentiation. *Biomaterials.* **32** 48-56 (2011)

58. Hayashi K, Tabata Y. Preparation of stem cell aggregates with gelatin microspheres to enhance biological functions. *Acta Biomater.* **7** 2797-803 (2011)
59. Paoli P, Giannoni E, Chiarugi P. Anoikis molecular pathway and its role in cancer progression. *Biochim Biophys Acta.* **1833** 3481-3498 (2013)
60. Okamoto T, Mitsushashi M, Fujita I, Sindhu RK, Kikkawa Y. Induction of cytochrome P450 1A1 and 1A2 by hypoxia. *Biochem Biophys Res Commun.* **197** 878-85 (1993)
61. Song J, Leeuwenburgh SC. Sustained delivery of biomolecules from gelatin carriers for applications in bone regeneration. *Ther Deliv.* **5** 943-58 (2014)
62. Kawai K, Suzuki S, Tabata Y, Ikada Y, Nishimura Y. Accelerated tissue regeneration through incorporation of basic fibroblast growth factor-impregnated gelatin microspheres into artificial dermis. *Biomaterials.* **21** 489-99 (2000)
63. 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)
64. 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)
65. 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)
66. 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)
67. 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)
68. 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)
69. 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)
70. 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)
71. 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)

72. Nawrocka D, Kornicka K, Szydłarska 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)
73. 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)
74. Jordi Esquena: Water-in-water (W/W) emulsions. *Curr Opin Colloid Interface S.* **25** 109-119 (2016)
75. 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)
76. Venkatesh K, Sen D: Mesenchymal stem cells as source of dopaminergic neurons: a potential cell based therapy for parkinson's disease. *Curr Stem Cell Res Ther.* **12** 326-347 (2017)
77. Shin TH, Kim HS, Choi SW, Kang KS: Mesenchymal stem cell therapy for inflammatory skin diseases: clinical potential and mode of action. *Int J Mol Sci.* **18** (2017)
78. Singh A, Singh A, Sen D: Mesenchymal stem cells in cardiac regeneration: a detailed progress report of the last 6 years (2010-2015). *Stem Cell Res Ther.* **7** 82 (2016)
79. Ibraheim H, Giacomini C, Kassam Z, Dazzi F, Powell N: Advances in mesenchymal stromal cell therapy in the management of Crohn's disease. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* **12** 141-153 (2018)
80. Tokuda Y, Crene S, Yamaguchi Y, Zhou L, Falanga V. The levels and kinetics of oxygen tension detectable at the surface of human dermal fibroblast cultures. *J Cell Physiol.* **182** 414-420 (2000)
81. Copland IB, Lord-Dufour S, Cuerquis J, Coutu DL, Annabi B, Wang E, Galipeau J: Improved autograft survival of mesenchymal stromal cells by plasminogen activator inhibitor 1 inhibition. *Stem Cells.* **27** 467-477 (2009)
82. Zhang M, Methot D, Poppa V, Fujio Y, Walsh K, Murry CE: Cardiomyocyte grafting for cardiac repair: graft cell death and anti-death strategies. *J Mol Cell Cardiol.* **33** 907-21 (2001)
83. Xue X, Liu Y, Zhang J, Liu T, Yang Z, Wang H: Bcl-xL Genetic Modification Enhanced the Therapeutic Efficacy of Mesenchymal Stem Cell Transplantation in the Treatment of Heart Infarction. *Stem Cells Int.* **2015** 176409 (2015)
84. Lee EY, Xia Y, Kim WS, Kim MH, Kim TH, Kim KJ, Park BS, Sung JH: Hypoxia-enhanced wound-healing function of adipose-derived stem cells: increase in stem cell proliferation and up-regulation of VEGF and bFGF. *Wound Repair Regen.* **17** 540-7 (2009)

85. Hoch E, Schuh C, Hirth T, Tovar GE, Borchers K: Stiff gelatin hydrogels can be photo-chemically synthesized from low viscous gelatin solutions using molecularly functionalized gelatin with a high degree of methacrylation. *J Mater Sci Mater Med.* **23** 2607-17 (2012)
86. Hama H, Hioki H, Namiki K, Hoshida T, Kurokawa H, Ishidate F, Kaneko T, Akagi T, Saito T, Saido T, Miyawaki A: ScaleS: an optical clearing palette for biological imaging. *Nat Neurosci.* **18** 1518-29 (2015)
87. Cerchiari AE, Garbe JC, Jee NY, Todhunter ME, Broaders KE, Peehl DM, Desai TA, LaBarge MA, Thomson M, Gartner ZJ. A strategy for tissue self-organization that is robust to cellular heterogeneity and plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **112** 2287-92 (2015)
88. Dunn L, Prosser HC, Tan JT, Vanags LZ, Ng MK, Bursill CA: Murine model of wound healing. *J Vis Exp.* **28** e50265 (2013)