

京都大学	博士(薬学)	氏名	田中 悠太郎
論文題目	細胞を利用した疾患治療・病態解析を目的とした高機能化細胞スフェロイドの開発に関する研究		

(論文内容の要旨)

近年の細胞分化・培養技術の目覚ましい発展に伴い、細胞を利用した疾患治療や病態解析が大きく進歩してきた。その中で、細胞を三次元培養することで得られる細胞スフェロイドが細胞の機能や生存率の改善に有用であることが示され、細胞移植や薬剤スクリーニングへの利用が検討されている。申請者の所属する研究室ではこれまでに、微細加工技術により開発された基板を用いて、インスリン産生細胞を細胞スフェロイドとすることで、細胞からのインスリン放出性が改善すること、さらには補助細胞を混合することでインスリン放出がさらに増強可能であることを報告した。スフェロイドを構成する細胞の機能はスフェロイドのサイズに依存すると考えられるが、その詳細は不明である。また、免疫細胞を対象とした細胞スフェロイドに関する報告例はほとんどなく、スフェロイド化が免疫細胞の機能に及ぼす影響に関する情報は乏しい。そこで本研究では、細胞を利用した疾患治療や病態解析を目的とした高機能化細胞スフェロイドの開発を目的に、スフェロイドのサイズを厳密に制御した細胞スフェロイドを作製し、スフェロイドサイズがスフェロイド中の細胞機能に及ぼす影響について検討した。対象細胞としては、肝癌細胞と結腸癌細胞に加えて、代表的な免疫細胞としてマクロファージ(Mφ)を選択した。それぞれの細胞に特徴的な細胞機能を指標に、細胞機能に及ぼすスフェロイド化の影響を評価した。

第1章 肝細胞機能に及ぼすスフェロイドサイズの影響の解明

細胞スフェロイドの機能はそのサイズに依存すると考えられる。本章では、ヒト肝癌由来細胞株HepG2を選択し、細胞スフェロイドのサイズ制御による細胞機能の最適化を試みた。直径が100~600 μmのポリジメチルシロキサン製マイクロウェルを用いてHepG2細胞を培養することで、直径が195, 320, 493, 548 μmの4種類のHepG2スフェロイドを作製した。HepG2細胞からのアルブミン放出はスフェロイド化により上昇したが、その放出はサイズが最も小さいスフェロイドで最大となった。一方、cytochrome P450 1A1活性は、スフェロイドサイズが大きくなるにつれて上昇した。以上より、HepG2細胞の機能はスフェロイド化で上昇するものの、最適なスフェロイドサイズは対象とする細胞機能に依存することが示された。

第2章 癌転移・移植モデル作製効率化のための癌細胞スフェロイドの開発

抗癌剤スクリーニングなどに利用される担癌モデル動物の作製においては、癌細胞生着率の低さや個体間のバラツキの大きさが問題とされる。本章では、効率的な担癌モデル動物作製法の開発を目的に、マウス結腸癌細胞株colon26細胞をモデル癌細胞として選択し、前章と同じ方法でサイズの異なるcolon26細胞スフェロイドを作製した。移植後の生着に関与すると考えられる細胞接着分子インテグリンβ1、CD44、フィブロネクチンのmRNA発現は、スフェロイドのサイズが大きくなるにつれて増加した。そこで、注射針の内径よりも小さいsmallスフェロイド(直径169 μm)とmediumスフェロイド(直径240 μm)をマウス尾静脈内に投与したところ、懸濁細胞の場合と比較して、効率的な肺転移巣の形成が認められた。腫瘍増殖による肺重量の増加はsmallスフェロイド投与群で最も大きく、これには投与したスフェロイド数の関与が推察された。

第3章 細胞スフェロイド化によるマクロファージの細胞傷害活性の増強

M ϕ は細胞傷害性を示すM1型M ϕ と、免疫抑制性のM2型M ϕ に分類可能である。抗腫瘍効果を有するM1型M ϕ は、癌免疫療法における主要な免疫細胞種の一つである。通常M ϕ は単独で機能する細胞であり、M ϕ で構成される細胞スフェロイドに関する検討例はほとんどない。そこで本章では、スフェロイド化によるM ϕ の機能向上の可能性について検討した。マウスM ϕ 様細胞株J774.1細胞を用いて直径が328, 439 μm のサイズの異なる2種類のスフェロイドを作製したところ、懸濁J774.1細胞と比較して、腫瘍壊死因子- α の産生が亢進した。また、誘導型一酸化炭素合成酵素のmRNAの発現が亢進したことから、スフェロイド化によるM1型への分化促進が示唆された。そこで、M ϕ を利用した癌治療の可能性を検証するために、colon26細胞またはマウス乳癌細胞株4T1細胞と共培養したところ、いずれのサイズでもJ774.1細胞スフェロイドは癌細胞増殖を効率よく抑制した。以上より、M ϕ をスフェロイド化することで、M ϕ をM1型M ϕ へと誘導できることを見出し、抗腫瘍効果を増強することに成功した。

第4章 マクロファージの混合による腫瘍微小環境を模倣した癌細胞スフェロイドの開発

第2章では、癌細胞スフェロイドが担癌モデル動物の作製に有用であることを明らかにした。一般に、腫瘍微小環境は癌細胞に加えて種々の間質細胞で形成される。腫瘍中のM ϕ は腫瘍関連M ϕ と呼ばれるM2型M ϕ であり、腫瘍の形成や増殖、転移を促進する。したがって、癌細胞スフェロイドにM ϕ を混合することで腫瘍微小環境を模倣したスフェロイドが形成可能であり、癌細胞の生着および腫瘍形成がさらに効率化できる可能性がある。そこで本章では、癌細胞とM ϕ から成る混合細胞スフェロイドを構築し、M ϕ の混合が癌細胞の生着・増殖に及ぼす影響について検討した。チオグリコレート培地を投与したマウス腹腔から細胞を回収し、インターロイキン-4を含む培地で培養した細胞を腹腔M ϕ とした。この腹腔M ϕ とcolon26細胞を用いて、混合細胞比の異なる3種類の混合細胞スフェロイドを作製した。ここでスフェロイドサイズは、マウスへの投与を念頭に、第2章のsmallスフェロイドとほぼ同じサイズ(直径160~190 μm)とした。混合スフェロイドをマウス尾静脈内または皮下に投与したところ、M ϕ の構成比が最も高い混合細胞スフェロイド投与群で、肺あるいは皮下における腫瘍形成効率が最も高いことが示された。以上より、M ϕ 混合癌細胞スフェロイドが、担癌モデル動物の作製に有用であることを見出した。

以上、本研究では、種々の細胞種を対象にサイズの異なる細胞スフェロイドを作製し、スフェロイドサイズが細胞機能に多大な影響を及ぼすことを見出し、疾患治療または病態解析を目的とした細胞スフェロイド開発におけるスフェロイドサイズ制御の重要性を明らかにした。また、M ϕ を癌細胞スフェロイドに組み込むことで、腫瘍微小環境を模倣した癌細胞スフェロイドが作製可能であり、担癌モデル動物の作製に有用であることを見出した。本研究で得られた知見は、新たな細胞治療システムの開発ならびに病態解析モデルの作製に有用な情報を提供するものと考えられる。

(論文審査の結果の要旨)

近年の細胞分化・培養技術の目覚ましい発展に伴い、細胞を利用した疾患治療や病態解析が大きく進歩してきた。その中で、細胞を三次元培養することで得られる細胞スフェロイドが細胞の機能や生存率の改善に有用であることが示され、細胞移植や薬剤スクリーニングへの利用が検討されている。申請者は、細胞を利用した疾患治療や病態解析を目的とした高機能化細胞スフェロイドの開発を目的に、スフェロイドのサイズを厳密に制御した細胞スフェロイドを作製し、スフェロイドサイズがスフェロイド中の細胞機能に及ぼす影響について検討した。対象細胞としては、肝癌細胞と結腸癌細胞に加えて、代表的な免疫細胞としてマクロファージ(Mφ)を選択した。それぞれの細胞に特徴的な細胞機能を指標に、細胞機能に及ぼすスフェロイド化の影響を評価し、以下の新知見を得た。

まず、種々の細胞種(肝細胞、癌細胞、マクロファージ)を対象にサイズの異なる細胞スフェロイドを作製し、スフェロイドサイズが各種細胞の細胞機能に多大な影響を及ぼすことを見出し、疾患治療または病態解析を目的とした細胞スフェロイド開発におけるスフェロイドサイズ制御の重要性を明らかにした。また、Mφを癌細胞スフェロイドに組み込むことで、腫瘍微小環境を模倣した癌細胞スフェロイドが作製可能であり、担癌モデル動物の作製に有用であることを見出した。本研究で得られた知見は、新たな細胞治療システムの開発ならびに病態解析モデルの作製に有用な情報を提供するものと考えられる。

よって、本論文は博士(薬学)の学位論文として価値あるものと認める。また、平成29年2月22日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。

なお、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、平成31年3月31日まで当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。