

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

2016

田中 悠太郎



## 目次

### 総論の部

緒言	-----	1
----	-------	---

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	-----	2
------------------------------	-------	---

- 1.1 細胞スフェロイドのサイズ制御を目的とした PDMS 製マイクロウェル基板の作製
- 1.2 サイズの異なる HepG2 細胞スフェロイドの作製
- 1.3 HepG2 細胞スフェロイドからのアルブミン産生
- 1.4 HepG2 細胞スフェロイドにおける CYP1A1 活性
- 1.5 考察

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	-----	8
------------------------------------	-------	---

- 2.1 colon26 細胞スフェロイドの構築
- 2.2 colon26 細胞スフェロイドにおける接着分子 mRNA 発現の変化
- 2.3 colon26 細胞スフェロイドにおける細胞増殖
- 2.4 colon26 細胞スフェロイドをマウス静脈内投与後の肺転移巣形成
- 2.5 静脈内投与直後の肺組織中 colon26 細胞の検出
- 2.6 考察

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	-----	14
-----------------------------------	-------	----

- 3.1 J774.1 細胞を用いた細胞スフェロイドの作製
- 3.2 J774.1 細胞スフェロイドからの TNF- $\alpha$  産生
- 3.3 J774.1 細胞スフェロイドにおける connexin43 ならびに M-sec の mRNA 発現の変化
- 3.4 J774.1 細胞スフェロイド中の低酸素領域の評価
- 3.5 J774.1 細胞スフェロイドにおける M1/M2 分化
- 3.6 J774.1 細胞スフェロイドによる癌細胞増殖抑制
- 3.7 考察

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	-----	21
--	-------	----

4.1 colon26 細胞と M2 型 M $\phi$ を用いた混合細胞スフェロイドの作製	
4.2 蛍光標識した細胞を用いた混合細胞スフェロイドの混合比とそのマウス投与後の肺での体内挙動の評価	
4.3 混合細胞スフェロイドの移植効率の評価	
4.4 混合細胞スフェロイドの <i>in vitro</i> 細胞増殖	
4.5 考察	

結論	28
----	----

謝辞	30
----	----

## 実験の部

第 1 章 実験の部	31
------------	----

第 2 章 実験の部	33
------------	----

第 3 章 実験の部	35
------------	----

第 4 章 実験の部	37
------------	----

引用文献	40
------	----

## 総論の部

### 緒言

1907年、Ross Granville Harrison はリングル液中でのカエルの神経組織の維持・観察に成功した。これを端緒として、細胞を用いた生命科学研究が盛んに行われてきた。近代の医学薬学研究において、細胞を用いた実験が病態解析モデルとしての地位を確立していることは言うまでもない。さらに近年では、様々な細胞の単離・精製の報告が続いており、中でも2006年に山中伸弥教授らが報告した人工多能性幹(induced pluripotent stem: iPS)細胞を始めとする多能性幹細胞を用いた再生医療にも注目が集まる。

これまでの細胞を用いた研究では、その簡便さ故に懸濁状態もしくは単層培養の細胞を用いた研究が主流であった。しかしながら、ヒトを始めとする多細胞生物は複数の細胞が織りなす三次元構造体として活動する。すなわち、懸濁状態もしくは単層培養の細胞は本来の細胞間または細胞-細胞外基質相互作用が不十分で、細胞機能を発揮しきれていない可能性が考えられる。著者が所属する研究室ではこれまでに、細胞間相互作用を促進する細胞構造体として球状の多細胞構造体である細胞スフェロイドを開発し、これにより細胞機能が改善可能であることを報告してきた。細胞スフェロイドは懸濁状態の細胞と比較して優れた生理活性を示すことから、薬剤スクリーニングや細胞治療への利用が期待される。

細胞をスフェロイド化することによる細胞の生理活性の向上は、細胞間または細胞-細胞外基質相互作用の増加や、細胞スフェロイド中の酸素・栄養環境の変化が要因と考えられる。こうした細胞スフェロイドの機能特性は、スフェロイドサイズに依存すると考えられる。しかしながら、細胞スフェロイドのサイズが細胞機能に及ぼす影響を直接比較した報告は乏しいのが現状である。さらに、各臓器には機能の本体である実質細胞以外にも、間質細胞が存在し、中でも免疫細胞が豊富に存在する。しかしながら、免疫細胞のみ、若しくは免疫細胞が共存する細胞スフェロイドに関する報告は殆ど無い。そこで著者は、細胞スフェロイドのサイズを変化させた時の機能変化と免疫細胞の細胞スフェロイド化による影響を評価した。以下、本研究で得られた結果を4章にわたり論述する。

## 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

多数の細胞で構成される球形あるいは楕円球形の細胞集塊である細胞スフェロイドは、単層培養細胞よりも細胞間相互作用の機会が多く、細胞本来の機能を発揮しやすいと考えられる。したがって、細胞スフェロイドは、薬物代謝および毒性の試験[1-6]、および腫瘍転移の研究[7,8]に有用とされている。さらに、細胞スフェロイドの細胞療法[9-11]あるいは再生医療[12,13]への利用にも注目が集まっている。著者が所属する研究室ではこれまでに、マイクロモールディング技術を用いて構築されたポリジメチルシロキサン (PDMS) 製のマイクロウェル基板を使用して、均一なサイズの細胞スフェロイドの作製に成功した[14]。さらに、この方法を利用して作製したマウス $\beta$ 細胞株 NIT-1 細胞スフェロイドが、懸濁状態の細胞を投与した場合と比較して、マウス移植後の細胞生存期間を大幅に延長させることを報告している[9]。

スフェロイドのサイズは、スフェロイドの機能および特性を決定する上で重要なパラメータであることが予想される。これまでの研究で、ヒト肝癌細胞株 HepG2 細胞スフェロイドでは、スフェロイドの中心部で酸素濃度が低下することが報告されている[15-18]。この酸素濃度の低下は、低酸素誘導因子 (HIF)-1 を含む様々な分子の発現に影響を及ぼす[19]。さらに、スフェロイドを構成する細胞が細胞外の物質を取り込み、分泌産物を培地中に放出するためには、細胞間または細胞内の物質輸送が必要である。これらの現象は細胞スフェロイドのサイズが大きく影響すると考えられるにもかかわらず、スフェロイドサイズと細胞機能との関係は詳細には解明されていないのが現状である。特に直径が 300  $\mu\text{m}$  を超えるサイズの細胞スフェロイドに関する報告はほとんどない。

肝臓は種々の薬物の代謝臓器であり、肝細胞を用いた *in vitro* 薬物動態試験は代表的な前臨床試験の一つである。肝細胞による薬物代謝および細胞毒性の評価に汎用される細胞としてヒト肝細胞癌由来 HepG2 細胞が挙げられる[3,20,21]。HepG2 細胞は単層培養条件ではアルブミン産生能や薬物代謝能が極めて低い。そこで、HepG2 細胞スフェロイドを構築し、スフェロイドのサイズを厳密に制御することで、スフェロイドサイズと細胞機能との相関を明らかにすることができれば、HepG2 細胞を利用した前臨床試験の効率化が期待される。そこで本研究では、まず様々なサイズの HepG2 細胞スフェロイドを作製するために、直径が異なる PDMS 製マイクロウェルを開発した。細胞機能の指標として、肝細胞によって産生される最も豊富な血清タンパク質であるアルブミン[22]および芳香族炭化水素の代謝活性化に関与する主なチトクローム P450 (CYP) 酵素の 1 つであり、薬物動態変動の大きな要因の一つである CYP1A1[23]を選択し、マイクロウェル基板を用いて約 200~550  $\mu\text{m}$  の直径を持つ HepG2 細胞スフェロイドを構築し、サイズ変化が及ぼす細胞スフェロイドの機能変化を評価した。

### 1.1 細胞スフェロイドのサイズ制御を目的とした PDMS 製マイクロウェル基板の作製

初めに、これまでの研究により確立されたマイクロモールディング技術を用いて、サイズの異なる

マイクロウェル基板を作製した。直径の小さなものから順に、small, medium, large, extra large サイズのマイクロウェル基板とし、これらのマイクロウェル基板を用いて作製した細胞スフェロイドをそれぞれ small, medium, large, extra large 細胞スフェロイドとした。Figure 1 にサイズの異なるマイクロウェル基板を上部から、もしくは断面を撮影した顕微鏡像を示す。画像解析ソフトを用いて幅、半値幅、深さを測定した結果、いずれの場合も均一なマイクロウェル基板の作製に成功した (Table 1)。

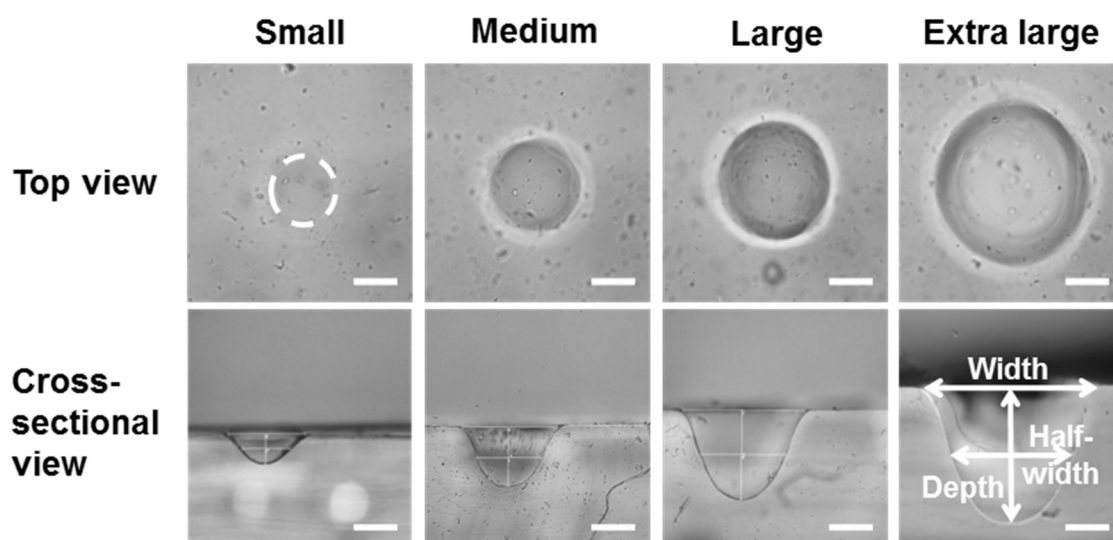


Figure 1. Microscopic images of microwell plates. Pictures of the upper and lower row represent top views and cross-section views, respectively. Scale bar in each image represents 200  $\mu\text{m}$ .

Table 1. Size parameters of the PDMS-based microwells.

	Size ( $\mu\text{m}$ )		
	Width	Half-width	Depth
Small	$357 \pm 18$	$237 \pm 10$	$123 \pm 5$
Medium	$448 \pm 21$	$315 \pm 9$	$258 \pm 4$
Large	$557 \pm 25$	$400 \pm 4$	$400 \pm 6$
Extra large	$765 \pm 36$	$547 \pm 18$	$602 \pm 10$

Results are expressed as the mean  $\pm$  SD of five measurements.

## 1.2 サイズの異なる HepG2 細胞スフェロイドの作製

Figure 2 に、得られたマイクロウェル基板を用いて作製した 4 種類のサイズの異なる HepG2 細胞スフェロイドの顕微鏡像を示す。それぞれのサイズのスフェロイドの画像をもとに、100 個のスフェロイドの直径を測定したときのサイズ分布を Figure 3 に示す。いずれの場合も均一なサイズのスフェロイドが得られた (Table 2)。また、各サイズのスフェロイドに含まれる細胞数はスフェロイドの直径が大きくなるにつれ増加した。さらに、トリパンブルー色素の排除を指標に、スフェロイドをトリプシンで崩壊させることで得た細胞懸濁液における HepG2 細胞の生存率を評価した。その結果、いずれのサイズのスフェロイドにおいても、スフェロイドを構成する HepG2 細胞は、100%に近い高い生存率を保っていた。

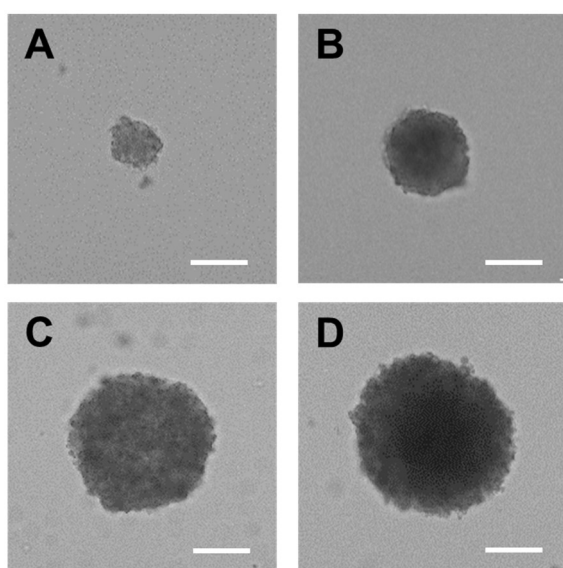


Figure 2. Microscopic images of HepG2 spheroids. Images of HepG2 spheroids were taken under a microscope, and typical images are shown: (A) small, (B) medium, (C) large, and (D) extra large HepG2 spheroids. Scale bar in each image represents 200  $\mu\text{m}$ .

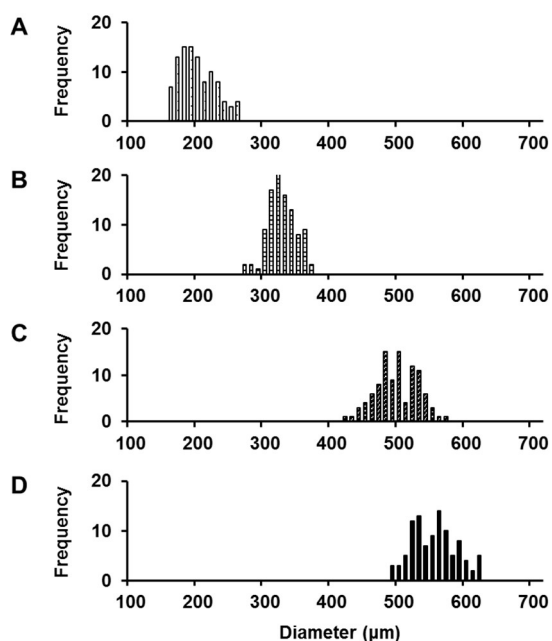


Figure 3. Size distributions of HepG2 spheroids. The histograms of the diameter of 100 spheroids were measured under a microscope: (A) small, (B) medium, (C) large, and (D) extra large HepG2 spheroids.



Table 2. Characteristics of HepG2 spheroids.

	Diameter ( $\mu\text{m}$ )	Cell number	Viability (%)
Small	195 $\pm$ 27	1,500 $\pm$ 220	95.4 $\pm$ 2.9
Medium	320 $\pm$ 21	4,080 $\pm$ 360	97.6 $\pm$ 1.7
Large	493 $\pm$ 32	8,450 $\pm$ 510	96.5 $\pm$ 1.7
Extra large	548 $\pm$ 33	13,000 $\pm$ 1,300	94.1 $\pm$ 1.1

Diameter is expressed as the mean  $\pm$  SD of 100 measurements.  
 Cell number and viability are expressed as the mean  $\pm$  SD of five measurements.

### 1.3 HepG2 細胞スフェロイドからのアルブミン産生

次に、HepG2 細胞のスフェロイド化とそのサイズがタンパク合成に及ぼす影響を明らかにするために、産生されるアルブミンを定量した。その結果、単層培養した HepG2 細胞と比較して、small サイズの HepG2 細胞スフェロイドにおいて単層培養した HepG2 細胞と比較して約 3 倍のアルブミンが産生された。その一方で、アルブミン産生量はスフェロイドサイズが大きくなるにつれて低下した。

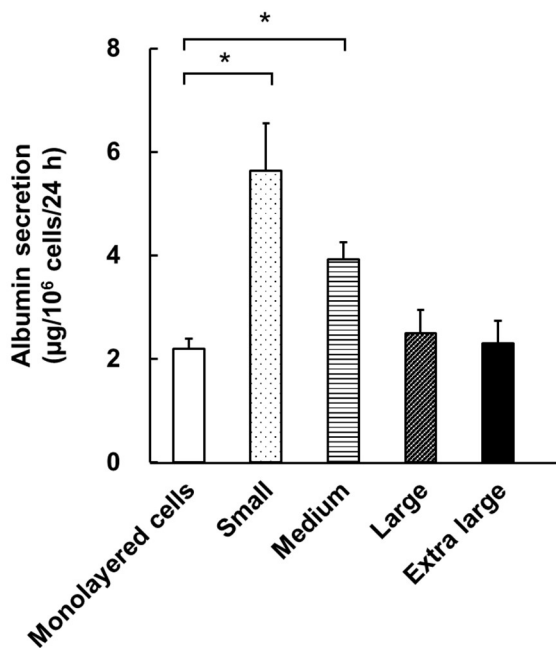


Figure 4. Albumin secretion of HepG2 cells. Monolayered HepG2 cells (suspended before use) or HepG2 spheroids were added to each well of a 6-well culture plate at approximately  $1 \times 10^5$  cells/well. The concentration of albumin in culture media was measured 24 h after incubation. Results are expressed as mean  $\pm$  SD of five measurements. A representative experiment of three independent experiments with similar results is presented. \*P < 0.05.

#### 1.4 HepG2 細胞スフェロイドにおける CYP1A1 活性

HepG2 細胞の CYP1A1 活性を評価することを目的に、7-ethoxyresorufin を基質として ethoxyresorufin-Odeethylase (EROD) アッセイを行った。その結果、単層培養した HepG2 細胞と比較して、スフェロイド化することで代謝活性は上昇した。また、アルブミンの結果とは異なり、CYP1A1 活性は細胞スフェロイドサイズの増大に伴い増加した。

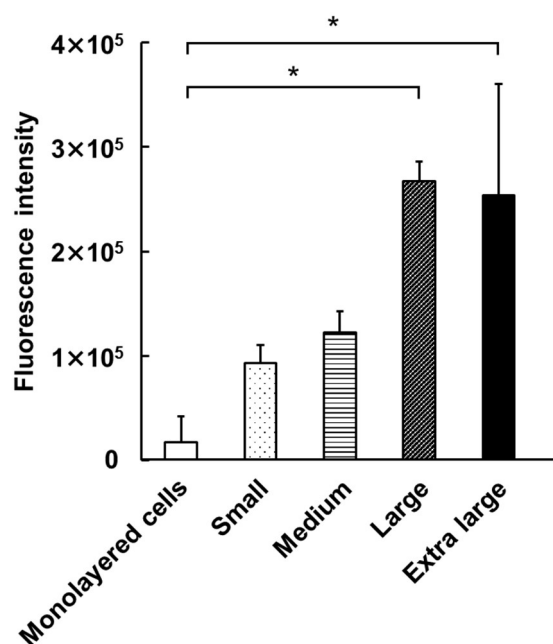


Figure 5. EROD activity of HepG2 cells.  $8 \times 10^4$  monolayerd HepG2 cells and HepG2 spheroids which correspond with  $8 \times 10^4$  HepG2 cells were incubated with  $10\mu\text{M}$  of 7-ethoxyresorufin for 1h. After the incubation, the supernatants were used for measurement of fluorescence intensity with FluoroMax-4. Results are expressed as mean  $\pm$  SD of three measurements. A representative experiment of five independent experiments with similar results is presented. \* $P < 0.05$ .

#### 1.5 考察

今回の研究で用いた PDMS 製マイクロウェル基板による細胞スフェロイド作製方法は、non-adhesive surface 細胞培養法や hanging drop 細胞培養法などの他の技術より生産性とサイズの均一性の点で優れている[14]。HepG2 細胞を用いた今回の検討においても、PDMS 製マイクロウェル基板を用いることで、サイズの分布が小さい、サイズの異なる細胞スフェロイドが効率的に作製できることが示された。

細胞スフェロイドのサイズに関しては、いくつかの論文で細胞機能との関係について議論されている。例えば、直径  $125\sim 250\mu\text{m}$  の HepG2 細胞スフェロイドに関する検討では、スフェロイドサイズが増加するにつれてアルブミン産生が増加することが報告されている[20]。また、 $\alpha$ -フェトプロテインおよびアルブミン、フィブリノーゲンの分泌を評価した検討では、HepG2 細胞スフェロイドの直径が  $100\sim 250\mu\text{m}$  の範囲では、細胞スフェロイドのサイズはこれらの機能に影響しないことが報告されている[21]。しかしながら、直径が  $250\mu\text{m}$  より大きい HepG2 細胞スフェロイドの特性については明らかではない。

直径が  $180\mu\text{m}$  を超える HepG2 細胞スフェロイドでは、スフェロイド内部への酸素および栄養分

の輸送が大幅に低下することから、スフェロイドの中心近傍の細胞は細胞死が誘導されるとする報告がある[20,24]。これらの報告は、**large** および **extra large** サイズの HepG2 細胞スフェロイドの高い生存率 (94%以上) を示す今回の研究の結果と一致しない。一方で、培地中のグルコース濃度の増加が、癌細胞スフェロイドにおける細胞死を抑制することが報告されている[18,25]。この研究に従って、**large** および **extra large** サイズの HepG2 細胞スフェロイド培養の際には、**small** および **medium** サイズのものと比較して約 3 倍の培地量とすることで、生存率は大幅には低下しなかった (Table 2)。

これまでの検討で、HepG2 細胞および肝細胞の細胞機能が、細胞間相互作用のために細胞スフェロイド形成によって改善されることが報告されている。すなわち、細胞スフェロイドのサイズを大きくし、細胞間相互作用を増大させることは、細胞スフェロイド中での HepG2 細胞におけるアルブミン分泌および EROD 活性の増強を説明する要素となりうる[1,2,14,26]。

タンパク質分泌および薬物代謝は、肝臓の 2 つの主要な機能である。本研究では、HepG2 スフェロイドの機能を評価する指標としてアルブミン分泌および CYP1A1 活性を選択した。過去の報告では、アミノ酸濃度の低下が、肝臓および単離された肝細胞の両方におけるアルブミン分泌の速度を減少させることが報告されている[27,28]。同様に、ラットのアルブミン分泌速度はラットの食事のタンパク質を制限することで低下した[29-32]。今回作製した HepG2 細胞におけるサイズ依存的なアルブミン分泌の低下も、サイズが大きくなるにつれて細胞にアミノ酸が十分に届かない領域が増加したことが原因である可能性が考えられる。

一方、過去の研究では、ヒト肝細胞およびヒト肝細胞癌細胞を用いて細胞スフェロイドを形成させることで、単層細胞と比較して CYP1A1 タンパク質および遺伝子のそれぞれの発現が高いことが報告されている[33,34]。さらに、ラットを低酸素状態に 48 時間曝露すると、肝臓における EROD 活性が増加することが報告されている[35]。細胞スフェロイドの中心領域は低酸素条件下であることから、HepG2 細胞スフェロイドのサイズが大きくなるにつれて、HepG2 細胞スフェロイドにおいても低酸素領域が増加することが考えられる。すなわち、本研究における EROD 活性の上昇は、スフェロイドサイズ依存的な低酸素領域の拡大に起因する可能性が高い。

以上、本章では、幅が 360 および 450、560、770  $\mu\text{m}$  の PDMS 製マイクロウェル基板を開発し、均一なサイズの HepG2 細胞スフェロイドを作製することに成功した。また、スフェロイド化により HepG2 細胞のアルブミン分泌および CYP1A1 活性が向上すること、一方でスフェロイドサイズの影響は評価対象により異なることを見出した。これらの知見は、細胞スフェロイドのサイズを制御することが細胞機能を制御する上で重要であることを示すものである。

## 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

抗癌剤などの薬物スクリーニングには、一般に二次元単層培養された癌細胞が用いられてきた。しかしながら、単層培養された癌細胞は固形腫瘍中の癌細胞とは大きく異なる存在状態であり、*in vivo* 固形腫瘍の代替モデルとは言えない点が多い[36,37]。そこで、より生理的条件に近い代替モデルの需要が高まった結果、三次元細胞構造体である細胞スフェロイドが注目されるようになった。細胞スフェロイドでは、栄養・酸素の濃度勾配や細胞間相互作用、細胞-細胞外マトリックス相互作用などに関してより生理的条件に近い環境が生み出され、遺伝子発現プロファイルをはじめとする増殖細胞やネクローシス、アポトーシスなどの細胞ごとの機能・現象が調節される[38-45]。したがって、細胞スフェロイドは癌研究モデルとして汎用される[46-54]。第 1 章でも述べたように、細胞スフェロイドのサイズは、スフェロイドを構成する細胞の機能および特性を決定する重要なパラメータである。しかしながら、癌細胞スフェロイドに関してもスフェロイドサイズが癌細胞の機能・特性に及ぼす影響については明らかではなく、サイズの異なる癌細胞スフェロイドを用いた *in vivo* での腫瘍形成に関する情報は皆無である。

そこで本章では、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、サイズを制御した colon26 細胞スフェロイドの細胞接着分子発現およびマウス静脈内移植後の肺転移巣の形成を評価した。

### 2.1 colon26 細胞スフェロイドの構築

第 1 章と同様の方法を用いて、サイズの異なる 4 種類の colon26 細胞スフェロイドを作製した (Figure 6)。各サイズ colon26 細胞スフェロイドを 100 個回収し、サイズ分布のヒストグラムの作製ならびに平均直径の計算をしたところ、得られた colon26 細胞スフェロイドはいずれのサイズでも均一であった。また、スフェロイド一個当たりの細胞数はスフェロイドサイズの増大に伴い増加した。また、構成細胞の生存率はいずれも高く、サイズによる顕著な違いは認められなかった (Table 3)。いずれのサイズの colon26 細胞スフェロイドも非常に固く、ハンドリングが容易であった。癌転移・移植モデルの作製には、作製した細胞スフェロイドをシリンジ投与する必要がある。マウスへの投与に用いる注射針の内径は 260~270  $\mu\text{m}$  程度であることから、注射針を通過可能な small と medium サイズの colon26 細胞スフェロイドを以下の実験では用いることとした。

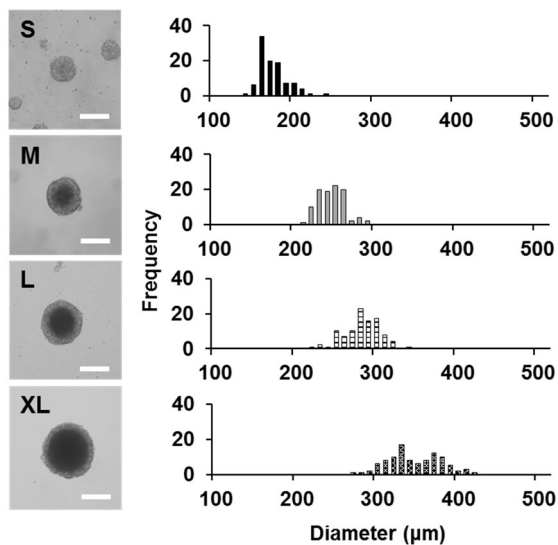


Figure 6. Microscopic images and size distribution of colon26 spheroids. Images and histograms of small, medium, large and extra large colon26 spheroids were taken under a microscope (magnification:  $\times 40$ ); representative images are shown. Scale bar in each image represents 200  $\mu\text{m}$ . For each sample, the diameters of 100 spheroids were measured under a microscope.

Table 3. Characteristics of colon26 spheroids.

	Diameter ( $\mu\text{m}$ )	Cell number (per spheroid)	Cell viability (%)
Small spheroid	$169 \pm 17$	$910 \pm 130$	$96.8 \pm 4.1$
Medium spheroid	$240 \pm 17$	$2,200 \pm 320$	$89.4 \pm 2.5$
Large spheroid	$272 \pm 26$	$3,850 \pm 570$	$93.7 \pm 1.7$
Extra large spheroid	$341 \pm 35$	$6,920 \pm 470$	$89.9 \pm 3.4$

Diameter is expressed as the mean  $\pm$  SD of 100 measurements.

Cell number and viability are expressed as the mean  $\pm$  SD of five measurements.

## 2.2 colon26 細胞スフェロイドにおける接着分子 mRNA 発現の変化

移植した際の細胞生着率に関わる接着分子の発現の変化について、代表的な接着分子としてインテグリン $\beta 1$ 、CD44、フィブロネクチンを選択し、各種 mRNA 発現量を real time RT-PCR 法で測定した (Figure 7)。その結果、colon26 細胞をスフェロイド化することで、懸濁状態の colon26 細胞と比較して、検討したいずれの接着分子の mRNA 発現が上昇した。また、接着分子の mRNA 発現量の増加はスフェロイドサイズに応じて増加する傾向が認められた。

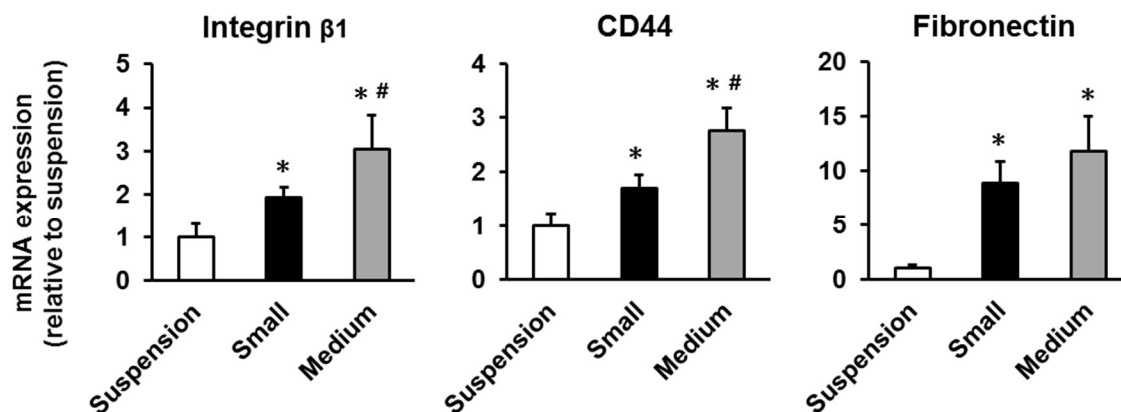


Figure 7. The mRNA expression of cell adhesion molecules of colon26 cells.(A) The mRNA expression of integrin  $\beta$ 1, CD44, and fibronectin was measured using quantitative RT-PCR analysis. The mRNA expression was normalized to that of  $\beta$ -actin and expressed relative to suspended colon26 cells. Results are expressed as mean  $\pm$  SD of five measurements. A representative experiment of three independent experiments with similar results is presented. \*P < 0.05 versus the suspension group; #P < 0.05 versus the small spheroid group.

### 2.3 colon26 細胞スフェロイドにおける細胞増殖

次に、colon26 細胞をスフェロイド化した時の細胞増殖に与える影響を明らかにするために、細胞数の経時変化を追跡した (Figure 8)。その結果、いずれのサイズにおいても細胞スフェロイド中で細胞増殖が確認された (Figure 8A)。しかしながら、懸濁状態の colon26 細胞を播種した場合と比較して、colon26 細胞スフェロイドでは有意に細胞増殖速度が低下することが明らかとなった (Figure 8B)。

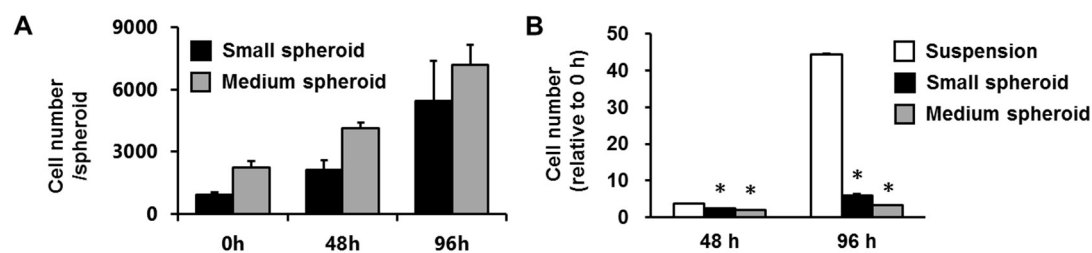


Figure 8. Proliferation rate of colon26 cells. (A) Cell number of colon26 spheroids was measured 0, 48 and 96 h after incubation. (B) The number of colon26 cells was measured 48 and 96 h after incubation and proliferation rate was determined by the number of cells at 48 or 96 h divided by the number initially added to culture plates. Results are expressed as mean  $\pm$  SD of five measurements. A representative experiment of two independent experiments with similar results is presented. \*P < 0.05 versus the suspension group.

### 2.4 colon26 細胞スフェロイドをマウス静脈内投与後の肺転移巣形成

これまで、colon26 細胞をスフェロイド化することで、接着分子の発現は上昇するものの、*in vitro* での細胞増殖は抑制されることを示した。そこで次に、肺転移巣形成効率を評価するために、

colon26 細胞の投与数が  $1.5 \times 10^4$  個となるように、small サイズの場合 17 個、medium サイズの場合 7 個のスフェロイドをマウスに尾静脈から投与した。投与 21 日後の肺を摘出し、肺表面の結節の形成を目視で確認するとともに肺重量を測定した (Figure 9)。その結果、懸濁状態の colon26 細胞を投与した群では肺での結節は見られなかったが、colon26 細胞スフェロイドを投与した群では肺結節が認められた (Figure 9A)。また、肺重量も colon26 細胞スフェロイド投与群でのみ有意に増加した (Figure 9B)。また、small サイズの colon26 細胞スフェロイドの方が、medium サイズの colon26 細胞スフェロイドよりも肺重量は有意に重かった。そこで、より効率的な肺転移巣を形成した small サイズの colon26 細胞スフェロイドについて、細胞数を変えてマウス尾静脈内に投与した。その結果、small サイズの colon26 細胞スフェロイドは 10 倍多い数の懸濁状態の colon26 細胞を投与した場合と同程度の肺重量の上昇が認められた (Figure 9C)。

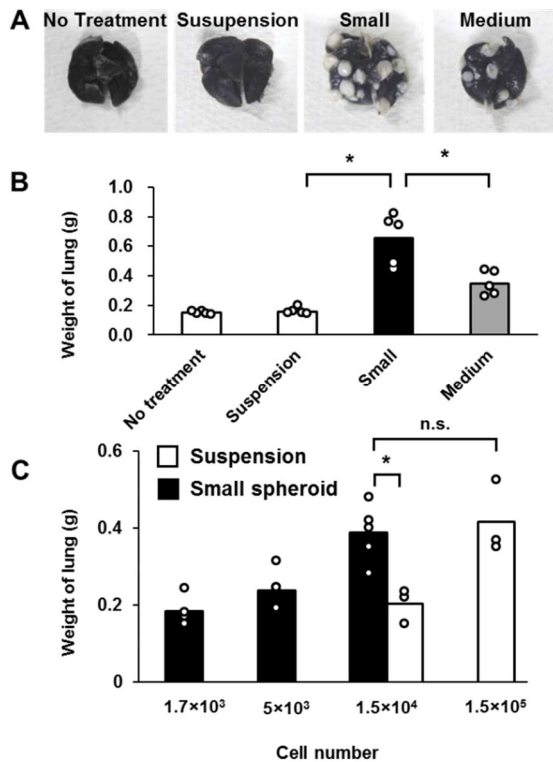


Figure 9. Images of lung and lung weight of mice after inoculation of colon26 cells

(A) Images of pulmonary tumors in lungs were taken by a digital camera 21 days after inoculation; representative images of each group are shown. (B) Weight of lungs from mice in each group was measured. Each symbol represents individual mice and bars represent the mean values. A representative experiment of three independent experiments with similar results is presented. \* $P < 0.05$ . (C) Weight of lungs from mice in each group was measured. Each symbol represents individual mice and bars represent the mean values. \* $P < 0.05$ .

## 2.5 静脈内投与直後の肺組織中 colon26 細胞の検出

投与された colon26 細胞スフェロイドが肺の毛細血管に効率良く捕捉されることが、colon26 細胞スフェロイドによる効率的な肺転移巣の形成に関与する可能性が挙げられる。そこで、懸濁状態の colon26 細胞ならびに small サイズの colon26 細胞スフェロイドをマウス尾静脈内投与直後の肺組織中への集積 (塞栓) を評価した。投与する colon26 細胞は 5, 6-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) で蛍光染色し、マウスに投与後 2 分後に肺を摘出し、肺を生体組織の

透明化技術の一種である CUBIC 法[55]を用いて透明化することで、肺組織中に存在する CFSE 標識 colon26 細胞を可視化した (Figure 10)。その結果、懸濁状態の細胞を投与した群では、2 分後に肺組織中に認められる蛍光が僅かであったのに対し、細胞スフェロイド投与群では強い蛍光が観察された。

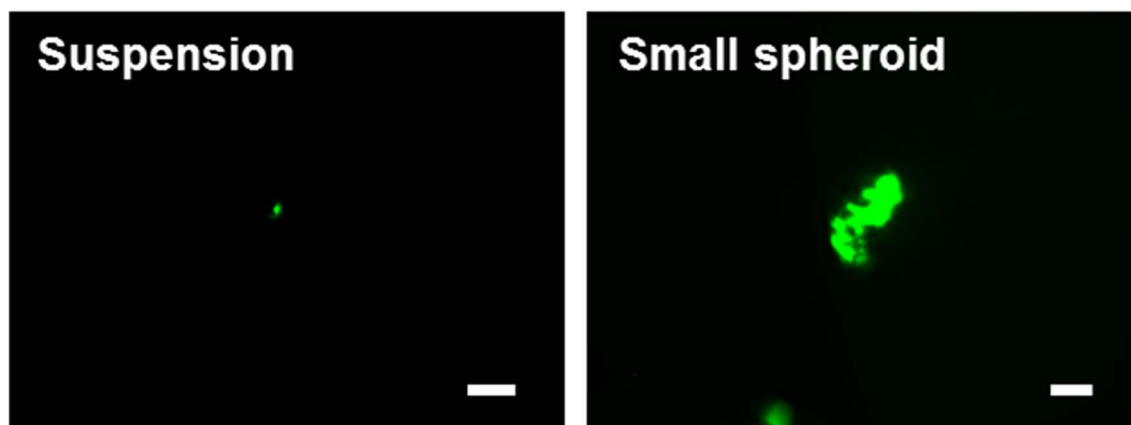


Figure 10 Images of CSFE-colon26 cells and CSFE-colon26 spheroids in the cleared lung at 2 min after inoculation were taken under a microscope (magnification:  $\times 40$ ); representative images are shown. Scale bars represent 100  $\mu\text{m}$ .

## 2.6 考察

本章では、第 1 章と同じ方法を用いることで、サイズ分布が狭い colon26 細胞スフェロイドの調製に成功した。また、異なるサイズの PDMS 基盤のマイクロウェルを使用して得た colon26 細胞スフェロイドにおいて、いずれの場合も接着分子の mRNA 発現が有意に増加すること (Figure 7)、一方で細胞の増殖速度は低下することを見出した (Figure 8)。さらに、small サイズの colon26 細胞スフェロイドは、懸濁状態の colon26 細胞と比較して非常に効率的に肺転移を形成することを実証した (Figure 9)。

癌細胞、特にヒトの癌細胞は、ヌードマウス等の実験動物に移植しても生着率が非常に低い場合が多く、担癌モデル動物の開発において再現性の低さが問題とされる[37,38]。したがって、本章で開発した癌細胞スフェロイドを用いる担癌モデルマウスの作製法は、*in vivo* での腫瘍形成を大幅に効率化し、多様な癌研究を加速させる可能性がある。

脂肪由来幹細胞からなる細胞スフェロイドのサイズが大きくなるにつれて、低酸素の指標である HIF-1 $\alpha$  の mRNA 発現が増加することが報告されている[24]。さらに、低酸素がインテグリン  $\beta 1$ 、CD44、およびフィブロネクチンの mRNA 発現を誘導することも報告されている[39-41]。したがって、colon26 細胞スフェロイドの形成ならびに細胞スフェロイドのサイズの増加によるこれらの細胞接着分子の mRNA 発現の増加は、細胞スフェロイドの中心部における低酸素領域の増加に起因していると考えられる。

肺毛細管における細胞塞栓には、接着分子を介する特異的な相互作用に加えて、細胞または



細胞スフェロイドのサイズが大きな要因の一つと考えられる。Schrepfer らは、サイズの異なるポリスチレンマイクロスフェアを用いた検討から、直径 4~5  $\mu\text{m}$  のマイクロスフェアが肺を通過する一方で、直径 20  $\mu\text{m}$  のマイクロスフェアおよび直径 15~19  $\mu\text{m}$  の間葉系幹細胞 (MSC) が肺に塞栓することを報告している[56]。さらに、肺の毛細血管をニトロプルシドナトリウムにより拡張させることで、マイクロスフェアおよび細胞の肺通過量が増加することも示されている。また Fischer らは、直径 18  $\mu\text{m}$  の MSC および直径 7  $\mu\text{m}$  の骨髄由来単核細胞 (BMMC) の肺通過を比較し、肺毛細血管を通過した BMMC の数が MSC の 30 倍であると報告している[57]。本章での検討においては、small および medium サイズの colon26 細胞スフェロイドの直径は、それぞれ 169 および 240  $\mu\text{m}$  であり (Table 3)、平均直径が 15  $\mu\text{m}$  前後の懸濁状態の colon26 細胞の 10 倍以上であった。この大きさの違いが、colon26 細胞スフェロイドの静脈内投与後の肺における効率的な集積および転移巣形成に関与していると考えられる。

過去の報告では、静脈内投与直後の細胞は、大部分が肺に塞栓していることが報告されている [56,58,59]。その後、肝臓や脾臓などの他の臓器に再分布し、24 時間後には殆どの細胞が肺から消失する[58,59]。この肺での細胞集積には、インテグリンや CD44、セレクチンなどの細胞接着分子が関与するとされる[60,61]。原発腫瘍由来の癌細胞に比べて、腫瘍細胞株においてこれら細胞接着分子の発現が抑制されていることが報告されており[62,63]、担癌モデル動物の作製効率を低下させる要因である。細胞スフェロイドの形成によって、細胞接着分子の mRNA 発現が増加している (Figure 7) ことから、静脈内投与後の肺における colon26 細胞の肺転移巣形成に接着分子が関与する可能性が考えられる。

Takagi らは、細胞スフェロイドの形成によって、ヒト前立腺腫瘍細胞の増殖速度が低下することを報告している[50]。本章においても同様に、colon26 細胞でスフェロイド化により細胞増殖が抑制された (Figure 8)。また、細胞スフェロイドのサイズ増大に伴って、細胞増殖速度が低下することも見出した。よって、*in vivo* での colon26 細胞スフェロイド移植後の肺転移巣形成効率の増加は、細胞自身の増殖速度では物理的な塞栓の影響が大きいことを示唆する。また、small および medium サイズの colon26 細胞スフェロイド投与後の肺転移巣の大きさが両群間で同程度であったことから、colon26 細胞スフェロイドによる肺転移巣形成効率は、投与するスフェロイド数に依存する可能性が示された。

以上、本章においては、colon26 細胞スフェロイドのサイズを制御することが肺転移巣形成の効率化に重要であること、直径約 170  $\mu\text{m}$  の small スフェロイドが担癌モデルマウスの作製に最も効率的であることを明らかにした。

### 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

細胞免疫療法は癌に対する有望な治療法の一つである[64-68]。近年の細胞培養および細胞加工技術の顕著な進歩により、細胞免疫療法が臨床応用されつつある[68,69]。細胞免疫療法の治療効果は、化学療法または放射線療法と組み合わせることで増強されることが期待されている。

細胞免疫療法に用いられる細胞には、T 細胞や樹状細胞をはじめとするいくつかの種類の免疫細胞が挙げられる。代表的な免疫細胞の一つであるマクロファージ (Mφ) は、循環末梢血単球の分化によって成熟し、末梢組織に存在する貪食細胞および抗原提示細胞である。Mφ は、機能に応じて M1 型 Mφ と M2 型 Mφ の 2 つに分類される。M1 型 Mφ は炎症を誘導する細胞である。M1 型への分化は、Mφ の抗腫瘍活性を増加させることが報告されている[70]。一方で、M2 型 Mφ は、インターロイキン (IL) -4 によって分化誘導され、抗炎症作用および組織修復作用を有する。

腫瘍関連 Mφ (tumor-associated macrophage: TAM) は、腫瘍内に存在する典型的な M2 型 Mφ であり、免疫抑制、血管新生および転移の促進を介して癌の進行を促進すると考えられている[71,72]。担癌マウスを用いた研究では、TAM を枯渇させることで腫瘍増殖が抑制されることが明らかとなっている[73,74]。一方、M1 型 Mφ は癌治療に有効であると考えられている。M2 型の TAM を、IL-21[75]またはポリ I:C[76]、ゾレドロン酸[77]で処理することで表現型が M1 型に変わることが示されており、これらを担癌モデルマウスに投与することで抗腫瘍効果があることが報告されている。したがって、Mφ の分化および機能を適切に制御し、抗腫瘍活性を有する M1 型 Mφ を効率良く調製することができれば、癌に対する細胞免疫治療に利用可能と考えられる。

著者が所属する研究室ではこれまでに、第 1 章および第 2 章で示した細胞に加えて、マウス線維芽細胞株 NIH3T3 細胞およびマウス大動脈内皮細胞株 MAEC 細胞、マウスインスリノーマ細胞株 NIT-1 細胞、マウス膵臓 β 細胞株 MIN6 細胞に関して、PDMS 製マイクロウェルを用いることで細胞スフェロイドが作製できることを報告している[9,14,78]。Mφ に関しても、細胞間相互作用が亢進する細胞スフェロイドとすることで、細胞機能の向上が期待される。スフェロイド化により M1 型への分化が促進される場合には、癌に対する細胞免疫療法への展開が期待される。そこで本章では、細胞スフェロイド化による Mφ の細胞傷害活性の増強を目的に、モデル細胞としてマウス Mφ 様細胞株 J774.1 細胞を用いて細胞スフェロイドを作製し、その機能を評価した。

#### 3.1 J774.1 細胞を用いた細胞スフェロイドの作製

第1章で作製したマイクロウェル基板を用いて、サイズの異なる 4 種類の J774.1 細胞スフェロイドの作製を試みた。しかしながら、small、medium サイズのマイクロウェル基板を用いた場合に回収可能な強度を持つ J774.1 細胞スフェロイドは得られなかった (data not shown)。一方で、large、extra large サイズのマイクロウェル基板を用いたところ、J774.1 細胞スフェロイドの作製に成功した。得られた細胞スフェロイドは、培養期間に関わらず large、extra large サイズでそれぞれおよそ直径が

250  $\mu\text{m}$ と400  $\mu\text{m}$ であり(Figure 11A)、マイクロウェルに充填した構造であった(Figure 11B)。Large、extra largeサイズのJ774.1細胞スフェロイド、他の細胞と比較すると細胞スフェロイドとしてはやや柔らかく、ピペッティングで破壊されやすいものの、回収するには十分な強度のスフェロイドが得られた。また、各サイズのJ774.1細胞スフェロイド1個あたりの細胞数はそれぞれlargeサイズで $5,630 \pm 180$ 個、extra largeサイズで $7,170 \pm 750$ 個あった。さらに細胞生存率はそれぞれlargeサイズで $98.2 \pm 0.9\%$ 、extra largeサイズで $95.2 \pm 2.0\%$ で100%に近い高い細胞生存率を保った。

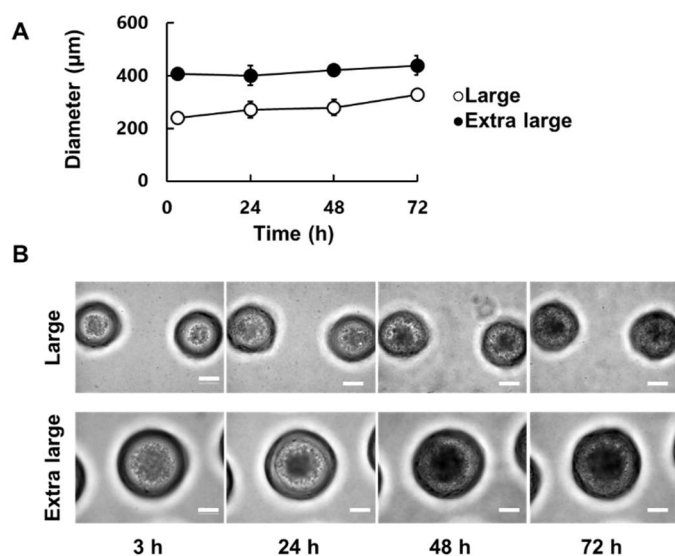


Figure 11. Size and appearance of J774.1 spheroids. (A) Size change of J774.1 spheroids in PDMS-based microwells. Results are expressed as mean  $\pm$  SD of five measurements. (B) Representative images of J774.1 spheroids in microwells (Scale bar = 200  $\mu\text{m}$ ).

### 3.2 J774.1 細胞スフェロイドからの炎症性サイトカイン産生

作製に成功した J774.1 細胞スフェロイドからのサイトカイン産生を評価するために、炎症性サイトカインの一種の腫瘍壊死因子(TNF)- $\alpha$  の培地中濃度を ELISA 法により測定した(Figure 12)。その結果、リポポリサッカライド(LPS)非存在下で培養した場合、TNF- $\alpha$  の産生量は細胞スフェロイド化によって高くなる傾向であった。また、LPS を 10 ng/ml の濃度で添加することで、いずれの群においても TNF- $\alpha$  産生量は増大した。このとき、単層培養した J774.1 細胞と比較して、extra large サイズの J774.1 細胞スフェロイドからの TNF- $\alpha$  産生量が有意に高い結果となった。以降の検討では、TNF- $\alpha$  の産生量が最も高かった extra large サイズの J774.1 細胞スフェロイドを用いた。

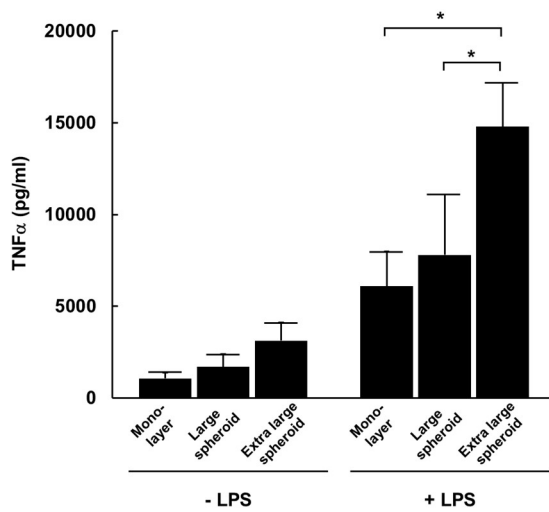


Figure 12. TNF- $\alpha$  release from J774.1 cells with and without 10 ng/mL LPS. TNF- $\alpha$  in the supernatant was measured after 8 h of incubation. Results are expressed as mean  $\pm$  SD of four measurements. \*P < 0.05.

### 3.3 J774.1 細胞スフェロイドにおける connexin43 ならびに M-sec の mRNA 発現の変化

J774.1 細胞の細胞間相互作用が亢進すると、ギャップ結合を構成する細胞接着タンパク質の一種である connexin43 が亢進すると考えられる。一方で、直接的な接着が不可能な距離における M $\phi$  間の細胞情報伝達を担う細胞膜ナノチューブのマスター遺伝子である M-sec の発現は、細胞同士が近接するために減少する可能性がある。そこで、extra large サイズの J774.1 細胞スフェロイド中の mRNA 発現を real-time RT-PCR 法で測定した (Figure 13)。その結果、J774.1 細胞をスフェロイドにすることで connexin43 の mRNA 発現量は有意に増加し、M-sec の mRNA 発現量は有意に減少した。

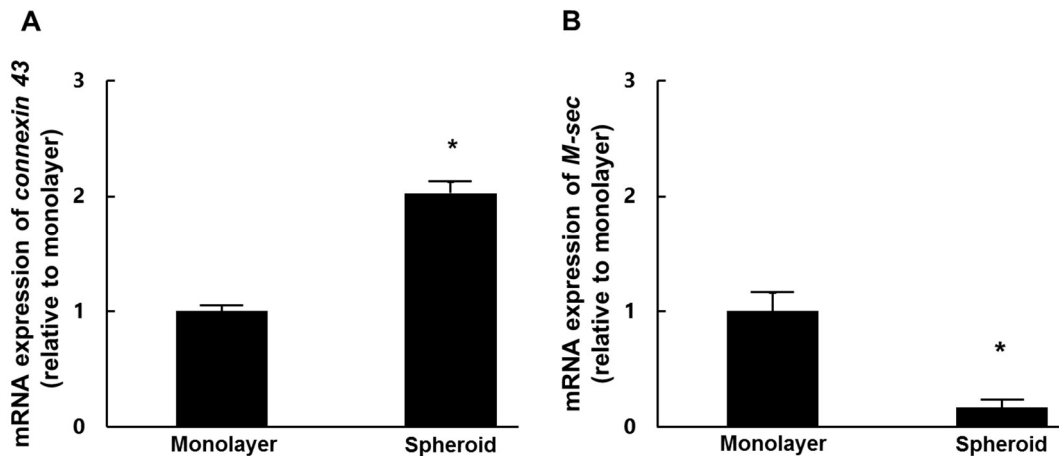


Figure 13. mRNA expression of (A) connexin 43 and (B) M-sec in J774.1 cells. The expression was normalized to GAPDH mRNA, and expressed relative to the monolayered J774.1 cells. Results are expressed as mean  $\pm$  SD of three measurements. \*P < 0.05 versus the monolayer cells.

### 3.4 J774.1 細胞スフェロイド中の低酸素領域の評価

J774.1 細胞スフェロイド内部の低酸素領域を検出するために、低酸素環境で蛍光を発する mono azo rhodamine (MAR) を培養上清に添加し 6 時間培養後、細胞スフェロイドの蛍光像を撮影した (Figure 14A)。その結果、通常の酸素分圧で単層培養した J774.1 細胞ではほとんど蛍光が認められなかったのに対し、低酸素分圧で単層培養した J774.1 細胞は強い蛍光が認められたことから、MAR が低酸素環境下の細胞内で蛍光を発することが確認された。そこで、通常の酸素分圧下の extra large サイズの J774.1 細胞スフェロイドに添加したところ、細胞スフェロイドでも強い蛍光が観察された。さらに、HIF-1 $\alpha$  のタンパク質量をウェスタンブロット法で評価したところ、単層培養した J774.1 細胞と比較して extra large サイズの J774.1 細胞スフェロイド群において高い HIF-1 $\alpha$  発現が認められた (Figure 14B, C)。さらに、細胞スフェロイドを懸濁し再酸素化を受けた細胞が産生する活性酸素種 ROS を、2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFDA) にて前処理した J774.1 細胞を用いたフローサイトメーターで解析した (Figure 14D)。その結果、低酸素分圧下で単相培養した J774.1 細胞同様、extra large サイズの J774.1 細胞スフェロイドでも有意に高い量の ROS が検出された。

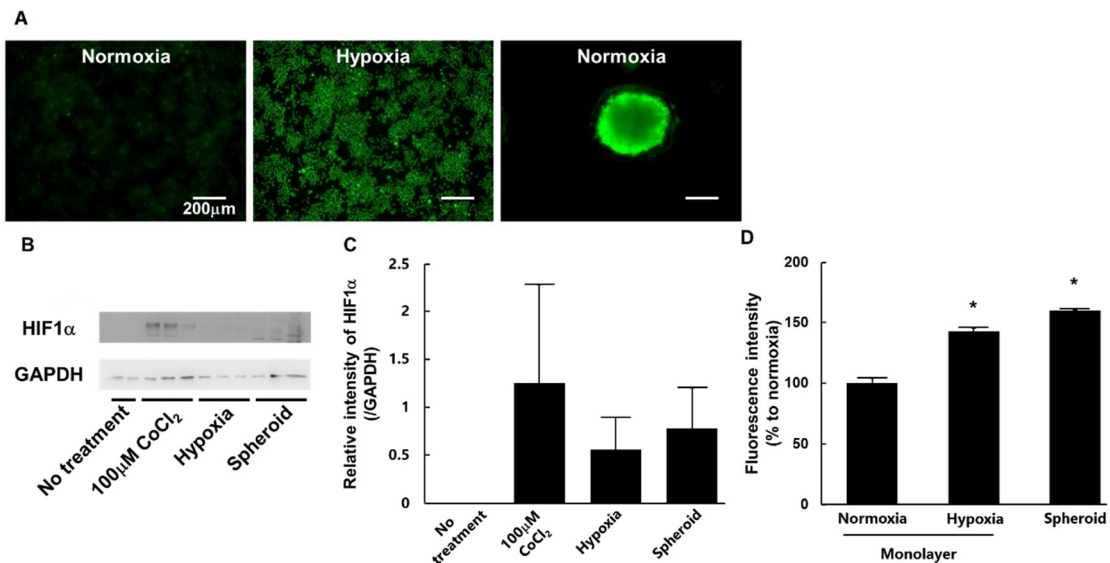


Figure 14. (A) Fluorescent images of monolayered J774.1 cells and J774.1 spheroids after incubation with MAR, hypoxia detection probe. Scale bar = 200  $\mu$ m. (B, C) Western blot of HIF-1 $\alpha$  in J774.1 cells and spheroids. Band image (B) and relative band intensity (C) were shown. (D) Intracellular ROS level of J774.1 cells. The mean fluorescence intensity derived from DCFDA in J774.1 cells was detected by flow cytometry and converted to a percentage of the untreated monolayer group. Results are expressed as mean  $\pm$  SD of three measurements. \*P < 0.05 versus the monolayer group under normoxic conditions.

### 3.5 J774.1 細胞スフェロイドにおける M1/M2 分化

細胞スフェロイド内での J774.1 細胞の M1/M2 分化を明らかにするために、M1 型 M $\phi$  ならびに M2 型 M $\phi$  にそれぞれ特徴的な遺伝子に着目し、それぞれの mRNA 発現を real-time RT-PCR 法

で評価した (Figure 15)。対照群として、インターフェロン (IFN)- $\gamma$  と LPS で刺激した M1 型 J774.1 細胞と、IL-4 で刺激した M2 型 J774.1 細胞を別途調製した。M1 型に特徴的な遺伝子は M1 型 J77.1 細胞、M2 型に特徴的な遺伝子は M2 型 J77.1 細胞における遺伝子発現量を 1 とした時、J774.1 細胞スフェロイドでは M1 型 M $\phi$  に特徴的な遺伝子である誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS) やケモカイン CXCL10 の発現が見られたのに対し、M2 型 M $\phi$  に特徴的な遺伝子であるアルギナーゼ 1 (Arg1)、Ym1、マンノースレセプター CD206 は検出限界以下もしくは単層培養群以下の発現量であった。

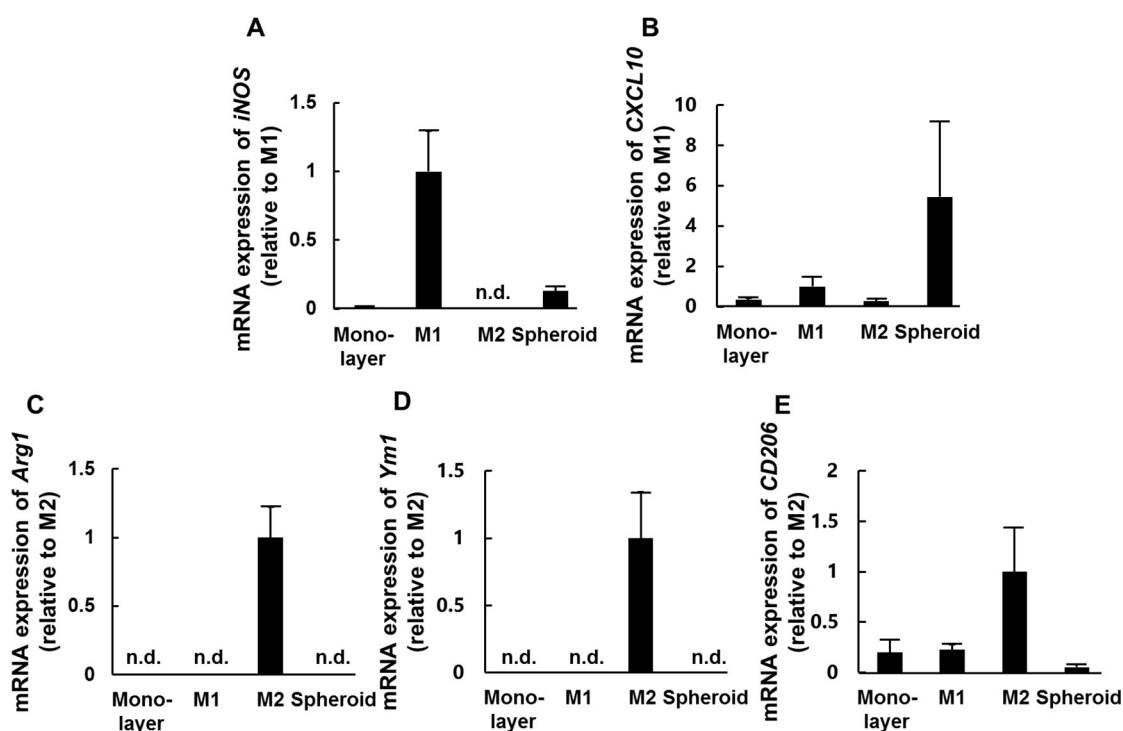


Figure 15. mRNA expression of (A) iNOS, (B) CXCL10, (C) Arg1, (D) Ym1 and (E) CD206 in J774.1 cells. The mRNA expression of iNOS and Arg1 was measured by real-time RT-PCR. The expression was normalized to GAPDH mRNA. Gene expression of iNOS and CXCL10 were expressed relative to the M1-type macrophages. Gene expression of Arg1, Ym1 and CD206 were expressed relative to the M2-type and M2-type macrophages. Results are expressed as mean  $\pm$  SD of three measurements.

### 3.6 J774.1 細胞スフェロイドによる癌細胞増殖抑制

最後に、J774.1 細胞スフェロイドの癌細胞増殖抑制効果の評価した。トランズウェルの上部チャンバーに懸濁状態の J774.1 細胞もしくは J774.1 細胞スフェロイドを、下部チャンバーに癌細胞を播種し、72 時間後に MTT 法を用いて癌細胞数を測定した (Figure 16)。モデル癌細胞として colon26 細胞およびマウス乳癌細胞株 4T1 細胞を選択した。その結果、J774.1 細胞スフェロイドを播種した群では、どちらの癌細胞においても懸濁状態の J774.1 細胞を播種した群と比較して有意に癌細胞数が減少した。

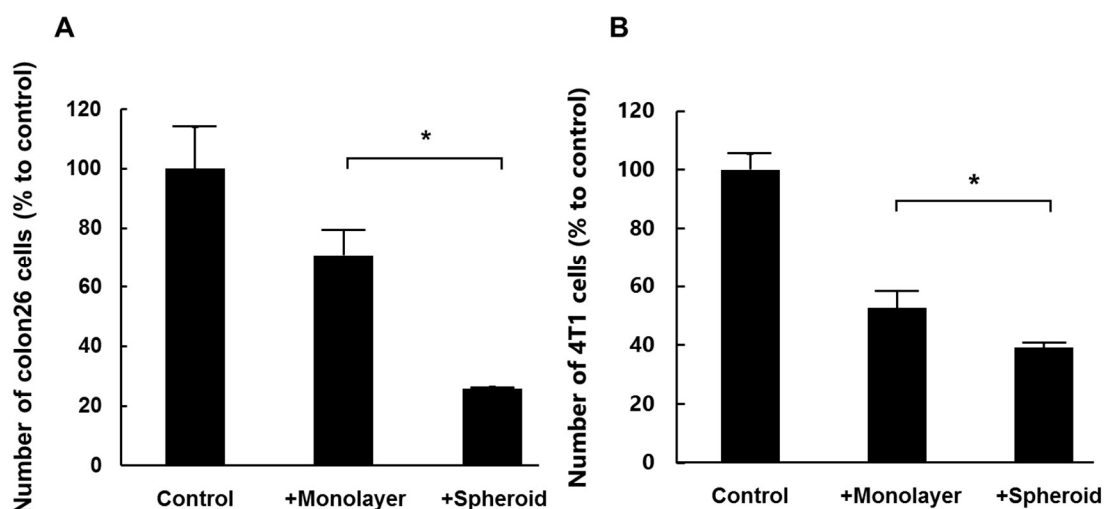


Figure 16. Number of (A) colon 26 cells and (B) 4T1 cells co-incubated with J774.1 cells. J774.1 and colon 26 cells were placed in the upper and lower chambers of Transwell plates, respectively. After 48 h, the number of colon 26 cells was measured by MTT assay. Results are expressed as mean  $\pm$  SD of three independent measurements. \*P < 0.05.

### 3.7 考察

これまでの報告では第1章、第2章で報告した細胞スフェロイドに加え、膵 $\beta$ 細胞[79]、間葉系幹細胞[80]、神経幹細胞[81]などの様々な種類の細胞を用いた細胞スフェロイドが開発されている。これらに加え、腫瘍微小環境を模した病態モデルとして、M $\phi$  様細胞と線維芽細胞を癌細胞とともに細胞スフェロイド化した報告も存在する[82]。しかしながら、M $\phi$  のみからなる細胞スフェロイドに関する報告はない。

本研究では、J774.1細胞のスフェロイド化によって、ギャップ結合を形成し、M $\phi$ 中の物質の輸送に関わる connexin43[83]の mRNA 発現量が増加すること、一方で、免疫細胞で強く発現し、細胞間を連結して情報伝達を担う細胞膜ナノチューブの形成因子である M-sec[84]の mRNA 発現量が低下することを見出した (Figure 13)。Connexin43 を介した細胞間連絡は、破骨細胞および M $\phi$  のサブセットにおいて重要な役割を果たすことが示されている[85]。この connexin43 の mRNA 発現量の増加ならびに M-sec の mRNA 発現量の低下は、J774.1細胞スフェロイドにおいて近距離に存在する M $\phi$  同士の直接的な細胞間相互作用が増加したためと推察される。

一般に、細胞スフェロイドは、直径が 200  $\mu$ m を超えると、酸素および栄養素、代謝産物など生理活性物質の濃度勾配が生じる[86]。特に、細胞スフェロイドの中心部では、酸素の透過が限られているため低酸素状態であることが報告されている[87]。低酸素状態下の細胞は、再酸素化されることで ROS を産生する。本研究では、低酸素応答性分子 MAR での蛍光観察、HIF-1 $\alpha$  のタンパク質発現、ならびに ROS 産生を確認し、J774.1細胞スフェロイドが低酸素に晒されていることを示した (Figure 14)。低酸素条件下で活性化される HIF-1 $\alpha$  は炎症性サイトカインの産生を介して炎症を惹起することが報告されている。J774.1細胞からの TNF- $\alpha$  産生も HIF-1 $\alpha$  の発現増加によるものではないかと考えられる。

本検討では、スフェロイド化することだけで J774.1 細胞が M1 型 M $\phi$  に分化することを見出した。これは、M $\phi$  を IFN- $\gamma$  および LPS とともにインキュベートする従来の調製方法と比較して、M1 型 M $\phi$  を調製する非常に簡単で低コストな方法である。M1 型サイトカイン [88-90] および M1 型 M $\phi$  マーカー [91] の発現は HIF-1 $\alpha$  によって制御されるため、この J774.1 細胞の M1 型への分化には、J774.1 細胞スフェロイド中の低酸素状態領域が関係している可能性が高い。

以上、本章では、J774.1 細胞のスフェロイド化が炎症性サイトカイン産生を増加させ、M1 型 M $\phi$  への分化を促進した結果、その癌細胞増殖抑制効果を増強可能であることを明らかとした。



## 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、colon26細胞単独で作製した癌細胞スフェロイドが担癌モデルマウスの作製に有用であることを示した。通常、固形腫瘍は癌細胞に加えて血管内皮細胞や線維芽細胞、M $\phi$ など種々の間質細胞で形成される[92]。したがって、癌細胞スフェロイドに間質細胞を組み込むことで、固形腫瘍の微小環境を模倣できる。また、間質細胞由来の増殖因子や接着分子が癌細胞の増殖や接着を促進する報告も存在することから、間質細胞を組み込んだ癌細胞スフェロイドを用いることで、移植後の生着および腫瘍形成をさらに効率化できる可能性がある。特に、腫瘍中のM $\phi$ は腫瘍関連M $\phi$ (TAM)と呼ばれるM2型M $\phi$ であり、腫瘍の形成や増殖、転移を促進することが報告されている[93,94]。これまでに細胞スフェロイドにM $\phi$ を組み込んだ報告は存在する[82]ものの、*in vivo*投与後の細胞の生着や、担癌モデル動物の作製に利用した研究は報告がない。そこで本章では、colon26細胞を癌細胞として、IL-4刺激したマウス腹腔M $\phi$ をM2型M $\phi$ として選択し、この2種類の細胞から成る混合細胞スフェロイドを構築した。得られた混合細胞スフェロイドを用いて、M2型M $\phi$ の混合がマウス移植後の癌細胞の生着・増殖に及ぼす影響について検討した。

### 4.1 colon26細胞とM2型M $\phi$ を用いた混合細胞スフェロイドの作製

混合細胞スフェロイドの作製には第1章で確立したmediumサイズのマイクロウェル基板を用いた。雌性BALB/cマウスの腹腔内にチオグリコレート培地を投与し4日間後に腹腔M $\phi$ を採取し、定法に従いIL-4で刺激することでM2型に分化させた。M2型への分化はArg1の発現により確認した(data not shown)。マイクロウェル基板に播種するcolon26細胞とIL-4刺激した腹腔M $\phi$ の細胞比率を、1:0(colon26細胞単独スフェロイド)、1:1、1:2、1:3とし、細胞混合比の異なる混合細胞スフェロイドを構築した。いずれの場合も混合細胞スフェロイドを得ることに成功し、いずれの場合もサイズ分布の狭い均一なスフェロイドとなった(Figure 17)。また、いずれの混合細胞スフェロイドにおいても、平均直径は約150  $\mu\text{m}$ となり、注射投与可能なスフェロイド直径となった。また、混合細胞スフェロイドのスフェロイドあたりの細胞数は細胞株であるcolon26細胞の播種混合比率の低下に伴って減少した。さらに、M $\phi$ の播種混合比率を増加させることで、細胞生存率は低下する傾向にあった(Table 4)。

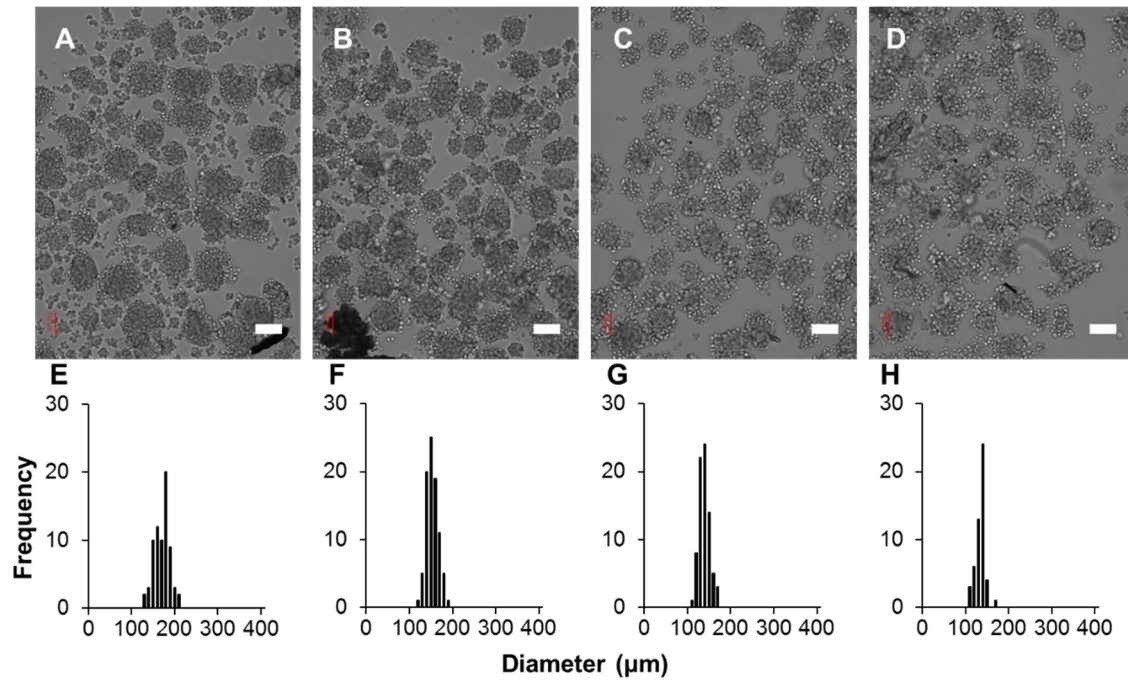


Figure 17. (A-D) Microscopic images and (E-H) size distribution of mixed spheroids of colon26 cells and IL-4 stimulated peritoneal macrophages. Images and histograms of (A, E) 1:0, (B, F) 1:1, (C, G) 1:2, (D, H) 1:3 of dispersed cell ratio of colon26 cells and IL-4 stimulated peritoneal macrophages, respectively. Representative images are shown. Scale bar in each image represents 100  $\mu\text{m}$ .

Table 4. Characteristics of mixed spheroids of colon26 cells and IL-4 stimulated peritoneal macrophages.

Dispersed cell ratio (colon26: macrophage)	Diameter ( $\mu\text{m}$ )	Cell number (per spheroid)	Cell viability (%)
1:0	$166 \pm 18$	$2,625 \pm 1,024$	100
1:1	$148 \pm 13$	$825 \pm 472$	100
1:2	$134 \pm 12$	$900 \pm 337$	$88.4 \pm 10.7$
1:3	$130 \pm 11$	$625 \pm 287$	$84.2 \pm 18.3$

Diameter is expressed as the mean  $\pm$  SD of 100 measurements.

Cell number and viability are expressed as the mean  $\pm$  SD of five measurements.

#### 4.2 蛍光標識した細胞を用いた混合細胞スフェロイドの混合比とそのマウス投与後の肺での体内挙動の評価

まず、各細胞の混合細胞スフェロイド中での混合比を評価するために、colon26 細胞を Cell Tracker™ Red CMTPX、IL-4 刺激腹腔 M $\phi$  を CFSE で蛍光標識した。得られた蛍光標識細胞を

用いて混合細胞スフェロイドを作製し、蛍光顕微鏡を用いて観察した(Figure 18A-D)。いずれの混合細胞スフェロイドにおいても、両細胞が同一スフェロイド中に存在することが確認された。

また、得られた混合細胞スフェロイドを崩壊させ得た懸濁液を用いて、フローサイトメーターによる解析を行った(Figure 18E-H)。その結果、播種する colon26 細胞と IL-4 刺激した腹腔 M $\phi$  の細胞混合比を、1:1、1:2、1:3 とすることで、混合細胞スフェロイドに含まれる M $\phi$  の比率は、それぞれ 16%、27%、35%となった。

さらに、M $\phi$  の影響を評価しやすくすることを目的に、IL-4 刺激腹腔 M $\phi$  の比率が最も高い 1:3 のもの選択し、マウスに尾静脈より移植後、2 分後に肺を摘出し、第 2 章と同様の CUBIC 法にて肺の透明化を行った(Figure 18I, J)。その結果、colon26 細胞単独のスフェロイドと混合細胞スフェロイドを移植した場合、いずれの場合も colon26 細胞由来の赤色蛍光が強く見られた。一方、混合スフェロイドを移植した場合、colon26 細胞と同一部分に IL-4 刺激した腹腔 M $\phi$  に由来する緑色蛍光が観察された。

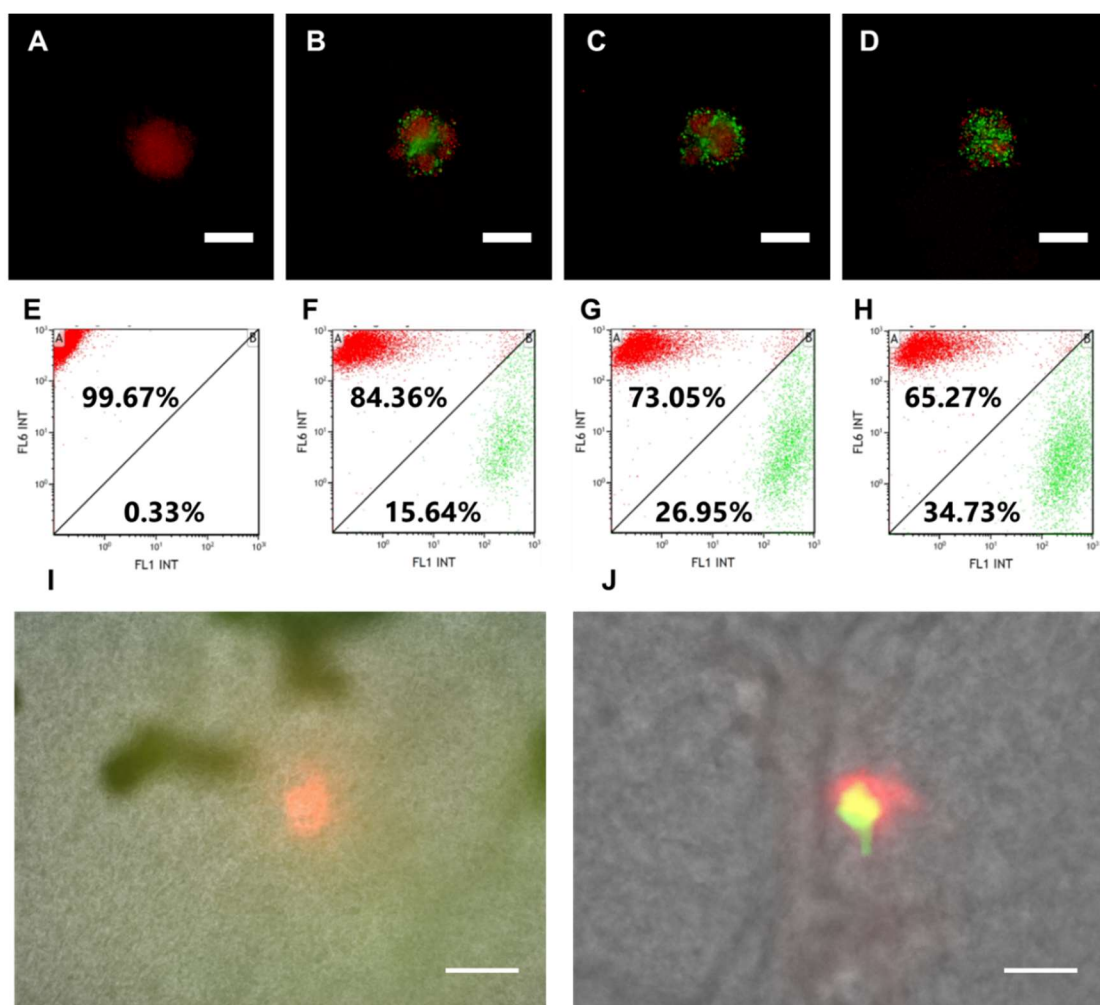


Figure 18. (A-D, I, J) Fluorescent images and (E-H) representation of flow cytometry results, showing the Cell Tracker Red-labeled colon26 cells and CFSE-labeled macrophages in mixed spheroids. Images and flow cytometry results of (A, E) 1:0, (B, F) 1:1, (C, G) 1:2, (D, H) 1:3 of dispersed cell ratio of colon26 cells and IL-4 stimulated peritoneal macrophages, respectively. (I, J) A pulmonary microembolism of the suspended mixture and mixed spheroids of colon26 cells and IL-4 stimulated peritoneal macrophages, respectively, after intravenous administration. Scale bar in each image represents 100 μm.

#### 4.3 混合細胞スフェロイドの移植効率の評価

まず、*in vivo*での肺転移巣の形成を評価するために、colon26細胞をマウス尾静脈内に投与し、16日後の肺重量を測定した (Figure 19A)。その結果、混合細胞スフェロイドを移植した場合、colon26細胞単独のスフェロイドを移植した群を含む他の群と比較して、有意に肺重量が増加した。次に、colon26細胞ならびに colon26細胞スフェロイドをマウス皮下に移植し、28日目まで経時的に皮下腫瘍のサイズを測定した (Figure 19B)。その結果、こちらも同様に混合細胞スフェロイド投与群で他の群と比較して有意な腫瘍サイズの増大が認められた。

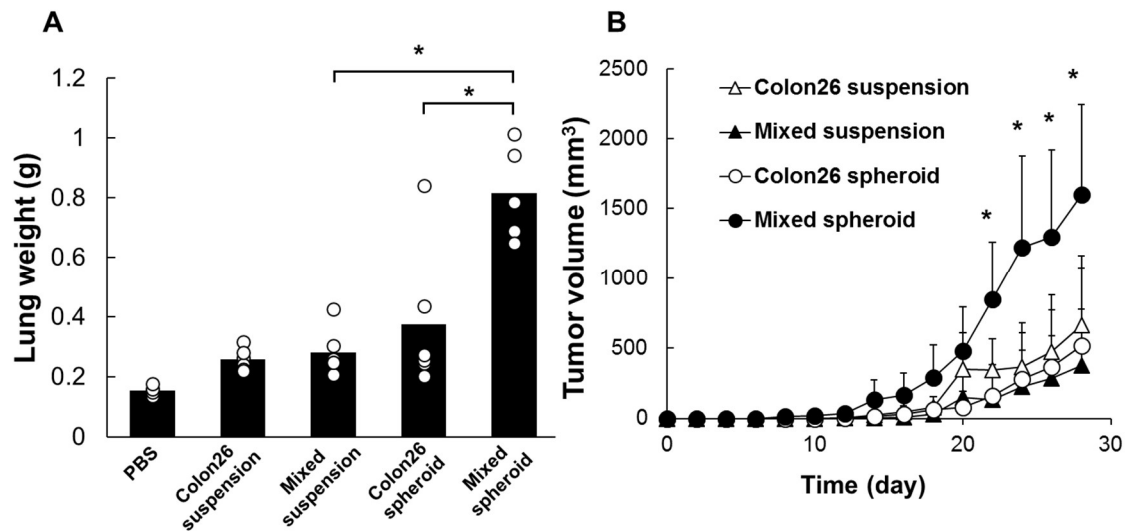


Figure 19. (A) Lung weight and (B) tumor size of mice after inoculation of the mixed spheroids. (A) Weight of lungs from mice in each group was measured. Each symbol represents individual mice and bars represent the mean values. A representative experiment of three independent experiments with similar results is presented. \*P < 0.05. (B) Size change of tumor after subcutaneously administered colon26 cells and spheroids. The tumor volume was measured by calipers every other day. \*P < 0.05 versus other group.

#### 4.4 混合細胞スフェロイドの *in vitro* 細胞増殖の評価

*In vivo* における腫瘍増殖の促進は、Mφ が colon26 細胞と相互作用し、細胞増殖シグナルの活性化が関与する可能性が考えられる。そこで、*in vitro* での細胞増殖速度を評価した。各細胞スフェロイド 1 つを 96 well 細胞培養プレートで培養後、経時的に顕微鏡観察と WST8 assay を行った (Figure 20)。3 日間の顕微鏡観察の結果、colon26 細胞単独スフェロイドと Mφ を含む混合細胞スフェロイドいずれの場合も細胞増殖が観察されたが、肉眼レベルでの大きな差は認められなかった (Figure 20A-D)。また、WST8 assay の結果も同様に、colon26 細胞単独スフェロイドと Mφ を含む混合細胞スフェロイドとの間に有意な細胞増殖の差は認められなかった (Figure 20E)。

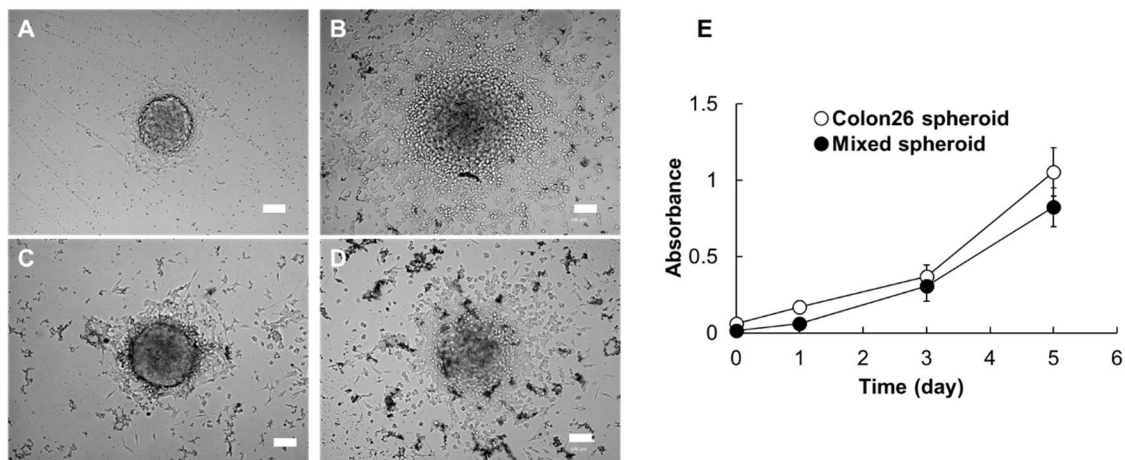


Figure 20. Evaluation of cell growth. (A-D) Microscopic images of spheroids at (A, C) 1 day and (B, D) 3 days after transfer of (A, B) colon26 spheroids and (C, D) mixed spheroids to 96-well plate. Scale bar in each image represents 100µm. (E) The viability of colon26 spheroids and mixed spheroids quantified by WST-8 assay.

#### 4.5 考察

過去には、腫瘍微小環境の一部を形成するTAMは、癌細胞を直接攻撃し、抗腫瘍免疫の一員として作用すると考えられてきた[95-97]。しかしながら、TAM は種々のヒト腫瘍において癌細胞の生着・増殖・転移を促進する作用があることが判明してきた[98]。

Dulucらは、卵巣がん患者では白血球阻止因子、IL-6、およびM-CSFがM2型Mφの誘導を促進することを明らかにしている[99]。つまり、腫瘍微小環境では、癌細胞が細胞間相互作用し、Mφを「教育」し、M2型のTAMへと変化させる。本検討で得た混合細胞スフェロイド中のM2型Mφもcolon26細胞による「教育」を受け、さらなる活性化をもたらし、*in vivo*での生着率の増大に寄与している可能性が考えられる。一方で、マウスの腹腔から単離後にIL-4刺激をしないMφを用いて、混合細胞スフェロイドの作製を試みた。しかしながら、得られた細胞スフェロイドは歪な構造を取り、種々の実験に用いるには脆いものであった(data not shown)。マウスの腹腔からMφを回収する際、TGC培地でマウス腹腔を刺激している。こうして得られたMφは細胞傷害性のM1型Mφであることが報告されている[100]。つまり、IL-4刺激なしでは、Mφの細胞傷害活性が保たれていることが考えられる。その結果、スフェロイド中でMφがcolon26細胞を攻撃し細胞死が誘導され、歪な構造を持つ混合細胞スフェロイドになったことが推察される。

本研究では、M2型Mφをcolon26細胞スフェロイド中に組み込むことで、colon26細胞の生着を促進することを見出した。これまでの報告では、血管新生[101]やリンパ管新生[102,103]、細胞増殖[104]に関与する物質がM2型Mφから産生され、癌細胞の増殖に有利な環境が形成されることが示されている。Figure 18でも示されるように、M2型Mφを癌細胞スフェロイドに混合すると、スフェロイドの塞栓部位にM2型Mφが共局在する。つまり、M2型Mφが産生する腫瘍形成を促進す

る因子が腫瘍発生初期より積極的に癌細胞に作用することで、効率的な腫瘍形成をもたらしたと考えられる。

一方で、*in vitro* における腫瘍細胞の増殖は M2 型 M $\phi$  の混合による影響は受けなかった。これは M2 型 M $\phi$  が産生する腫瘍形成を促進する因子のうち、癌細胞に直接働き増殖を促進する可能性が低いことを表す。腫瘍微小環境では、宿主に由来する T 細胞や NK 細胞などの腫瘍形成を阻害する細胞と骨髄由来抑制細胞 (MDSC) や制御性 T 細胞 (Treg) などの腫瘍形成促進作用を持つ細胞が存在する[105]。混合細胞スフェロイドをマウスに投与した場合、M2 型 M $\phi$  が分泌した TGF- $\beta$  などの免疫抑制性のサイトカインが colon26 細胞に効率よく作用し、T 細胞や NK 細胞を抑制、もしくは MDSC や Treg を活性化した結果と推察される。今後さらなる検討が必要である。

以上、本研究では M2 型 M $\phi$  を混合した癌細胞スフェロイドを作製・移植することで、担癌モデルマウスを効率よく作成する新たな方法の開発に成功した。これらの結果は今後のがん治療法の開発に有用と考える。

## 結論

著者は 4 章にわたり、「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」をテーマに論述した。第 1 章から第 3 章においては、細胞機能に及ぼす細胞スフェロイドサイズの影響を明らかにするために、それぞれ肝細胞、癌細胞、Mφ の細胞株を対象に検討を、第 2 章と第 4 章では担癌モデルマウスの作成について検討を、第 3 章と第 4 章では Mφ を対象細胞として選択し、スフェロイドによる高機能化について検討をそれぞれ行い、以下の結論を得た。

### 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

生体適合性高分子 PDMS を用いてサイズの異なる 4 種のマイクロウェル基板の作製に成功した。このマイクロウェル基板を用いて、サイズを厳密に制御した 4 種の HepG2 細胞スフェロイドを得た。得られた HepG2 細胞スフェロイドを用いて、アルブミン産生は small サイズの HepG2 細胞スフェロイドで最も高いことを明らかとした。一方で、CYP1A1 活性はスフェロイドサイズ依存的に増大し、評価する細胞機能毎に適切な細胞スフェロイドサイズが存在することが明らかとなった。

### 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

第 1 章で作製したマイクロウェル基板を用いて、サイズの異なる均一な colon26 細胞スフェロイドの作製に成功した。また、colon26 細胞スフェロイドでは接着分子の mRNA 発現が増加した。さらに、small サイズの colon26 細胞スフェロイドが肺転移モデルマウスの作製に最も有用であることを見出した。

### 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

Large、extra large サイズのマイクロウェル基板を用いることで J774.1 細胞のスフェロイド化に成功した。また、J774.1 細胞スフェロイドでは、TNF- $\alpha$  の産生量が増加した。また、J774.1 細胞スフェロイドではスフェロイド内部の低酸素領域が確認できた。さらに、J774.1 細胞スフェロイド中で J774.1 細胞は M1 型に分化し、高い腫瘍細胞傷害活性を示した。

### 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

混合比率の異なる colon26 細胞と M2 型腹腔 Mφ の混合細胞スフェロイドの構築に成功した。また、マイクロウェル基板上に播種する細胞比を調節することで、混合細胞スフェロイド中の colon26 細胞と M2 型腹腔 Mφ の混合比を制御可能であった。さらに、colon26 細胞と M2 型腹腔 Mφ の混



合細胞スフェロイドを用いることで、担癌モデルマウスの腫瘍増殖が有意に亢進した。

以上本研究では、第1章から第3章において、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、第2章と第4章では、細胞スフェロイドを用いた担癌モデルの作製に成功し、細胞スフェロイド化が細胞の生着を効率よく促進することを明らかにした。最後に、第3章と第4章では、Mφを組み込んだ細胞スフェロイドの開発に成功し、腫瘍増殖を正または負に制御できる可能性を見出した。

本研究で得られた成果は、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。

## 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京都大学大学院薬学研究科 西川元也准教授、高橋有己助教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一同、特に実験の一部に御協力戴いた草森浩輔博士、水野成美学士、西川智子修士、水上優哉学士、荻野悠加様、守谷愛衣様、西村俊祐様に深謝します。

最後に、研究に専念できる環境を与えて下さった父 孝男、母 慶子に深く感謝致します。

## 実験の部

### 第1章 実験の部

#### 【1】試薬

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)、Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 培地、Hanks' balanced salt solution (HBSS) は日水製薬株式会社より購入した。ウシ胎仔血清 (FBS) は Thermo Fisher Scientific 社 (MA, USA) より購入した。ポリジメチルシロキサン (PDMS) と硬化用触媒 (CATALYST SILPOT 184) は東レ・ダウコーニング社から購入した。ポリ(N-イソプロピルアクリルアミド) (PNIPAAm) は Polysciences 社 (PA, USA) より購入した。トリパンプルーはナカライテスク社より購入した。トリプシンは Becton Dickinson 社 (MA, USA) より購入した。その他の試薬は、市販の特級品を用いた。

#### 【2】細胞株

ヒト肝癌由来細胞株 HepG2 細胞は、American Type Culture Collection 社 (Rockville, MD, USA) から購入した。細胞は、非動化した 10% FBS、0.15% 炭酸水素ナトリウム、100 units/ml ペニシリン、100 mg/ml ストレプトマイシン、2 mM L-グルタミンを添加した DMEM 培地で、37°C、5% CO<sub>2</sub>、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[9, 14, 78]。直径と高さが均一に 200、300、400、600  $\mu\text{m}$  に設計されたドーム状突起が整列した 4 種類のプラスチック樹脂性の master mold を、3-dimensional printing systems (Objet Geometries 社、Rehovot, Israel) 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 master mold を 60°C、2 時間以上静置することで硬化させた。PDMS を硬化させることで得た PDMS 製マイクロウェル基板から master mold 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基板は、6 well 細胞培養プレートへ設置後、エタノールに溶解した 1%PNIPAAm をマイクロウェル基板上に 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。マイクロウェルのサイズが小さなものから順に、small、medium、large、extra large サイズのマイクロウェル基板とした。

#### 【4】PDMS 製マイクロウェルのサイズ評価

得られた各サイズのマイクロウェル基板上の各ウェルの中間を切断し、断面図を顕微鏡下で観察することにより、マイクロウェルの幅、半値幅、深さを測定した。

#### 【5】細胞スフェロイドの作製

細胞スフェロイドは過去の報告に従って作製した[9, 14, 78]。6 well 細胞培養プレートに設置した

マイクロウェル基板を、UV 光照射下で 1 時間以上置くことで滅菌した。37°C に温めた DMEM 培地を満たした。その後、6 well 細胞培養プレートへ設置した small、medium、large サイズのマイクロウェル基板には基板あたり  $5 \times 10^6$  個、extra large の場合は  $1 \times 10^7$  個の細胞を播種した。その後、CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 72 時間、40~65 rpm で振盪しながら培養した。マイクロウェルに入り切らなかった基板上の余分な細胞は培地交換することで除去した。培地交換は、振盪開始から、30 分、24 時間、48 時間後に行った。Small、medium、large、extra large サイズのマイクロウェル基板を用いて得た HepG2 細胞スフェロイドをそれぞれ small、medium、large、extra large サイズの HepG2 細胞スフェロイドとする。

#### 【6】細胞スフェロイドのサイズ、細胞数、生存率の測定

上記の方法で作製した各サイズの HepG2 細胞スフェロイドを顕微鏡下観察し、撮影した HepG2 細胞スフェロイドの面積を測定し、円と仮定した時の直径を算出し、スフェロイド 100 個当たりのヒストグラムを作製した。また、細胞スフェロイドを培地 20  $\mu$ l 中に 10 個回収し、80  $\mu$ l のトリプシン溶液を加え、37°C、5 分処理後、ピペッティングにより細胞スフェロイドを破壊することで、細胞懸濁液を得た。得られた細胞懸濁液を用いて、トリパンブルー色素排除を指標に、スフェロイド当たりの細胞数と生存率を計測した。

#### 【7】HepG2 細胞スフェロイドからのアルブミン放出性

DMEM 培地を用いて回収した small、medium、large、extra large サイズの HepG2 細胞スフェロイドを、それぞれ 67、25、12、7 スフェロイド/well となるように 6 well 細胞培養プレートに播種した。別途、懸濁状の HepG2 細胞を、40 個のスフェロイドとほぼ同じ細胞数になるように、 $1 \times 10^5$  cells/well で播種した。24 時間培養後に上清を回収し、測定まで -80°C で保存した。上清中に放出されたヒトアルブミンの濃度は、Human Albumin ELISA Quantitation Set (Bethyl Laboratories、Montgomery、TX、USA)を利用して、製造プロトコルに従って測定した。

#### 【8】Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) アッセイ

CYP1A1 活性は 7-ethoxyresorufin の代謝を利用した EROD アッセイにより評価した。 $8 \times 10^4$  cells/well で懸濁状態の HepG2 細胞および HepG2 細胞スフェロイドを、10  $\mu$ M の 7-ethoxyresorufin を含む培地中で 24 well 細胞培養プレートに播種した。使用した small、medium、large、extra large サイズの HepG2 細胞スフェロイド数は、それぞれ 35、20、14、9 個であった。遮光しながら 1 時間インキュベートした後、7-ethoxyresorufin の代謝物由来の蛍光を、FluoroMax-4 分光蛍光光度計 (HORIBA、Ltd.、Kyoto、Japan)によって検出した。

#### 【9】統計学的解析

有意差検定は、二群間の比較にスチューデントの *t* 検定 (両側検定) を、三群以上の比較にはターキー-クラマー (Turkey-Kramer) 法による多重比較検定を実施した。また、 $P < 0.05$  を統計学的に有

意とした。

## 第 2 章 実験の部

### 【1】試薬

5,6-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE)は Dojindo Laboratories (熊本、日本) から購入した。他の試薬は第 1 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

マウス結腸癌細胞 colon26 細胞は、公益財団法人がん研究会から供与を受けた。Colon26 細胞は、10%非動化 FBS、0.15% 炭酸水素ナトリウム、100 units/ml ペニシリン、100 mg/ml ストレプトマイシン、2 mM L-グルタミンを添加した RPMI 培地で、37 °C、5% CO<sub>2</sub>、加湿条件下で培養した。

### 【3】実験動物

6 週齢の BALB/c 系雌性マウスを日本 SLC 株式会社 (静岡、日本) 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】PDMS 製マイクロウェルの作製

PDMS 製マイクロウェル作製は、第 1 章と同様の方法で行った。

### 【5】細胞スフェロイドの作製

細胞スフェロイドの作製は、第 1 章と同様の方法で行った。

### 【6】細胞スフェロイドのサイズ、細胞数、生存率の測定

細胞スフェロイドのサイズ、細胞数、生存率の測定は、第 1 章と同様の方法で行った。

### 【7】Real-time PCR 法

Colon26 細胞からの total RNA 抽出は、Sepasol-RNA I Super G (ナカライテスク、京都、日本) を用いて行った。RNA 濃度は Nanodrop 2000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA) を用いて測定した。逆転写は、ReverTra Ace qPCR RT Kit (TOYOBO、大阪、日本) を用いて行った。mRNA 発現の定量的解析には、StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems (Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA) を用いて定量的リアルタイム PCR を行った。インテグリンβ1 のオリゴヌクレオチドプライマーには、forward (5'-GCAACGCATATCTGGAAACTTG-3') と reverse (5'-CAAAGTGAAACCCAGCATCC-3') を、CD44 のオリゴヌクレオチドプライマーには、forward (5'-TTCATCCCAACGCTATCTGTG-3') と reverse (5'-CGAAGGAATTGGGTAGGTCTG-3') を、

フィブロネクチンのオリゴヌクレオチドプライマーには、forward (5'-CTTTGGCAGTGGTCATTTTCAG-3')と reverse (5'-ATTCTCCCTTTCCATTCCCG-3')を、 $\beta$ -アクチンのオリゴヌクレオチドプライマーには、forward (5'-CATCCGTAAGACCTCTATGCCAAC-3')と reverse (5'-ATGGAGCCACCGATCCACA-3')を利用した。DNA増幅条件として、95°C 3秒、60°C 30秒を40サイクル繰り返した。増幅産物は、fluorescent dye SYBR green のインターカレーションを利用して検出した。標的遺伝子の mRNA 発現に対する相対定量時の標準として、 $\beta$ -アクチンを用いた。

#### 【8】細胞増殖の評価

PNIPAAm をコートすることで細胞接着を抑制した 24 well 細胞培養プレートに 40 個の colon26 細胞スフェロイドを播種した。懸濁状の colon26 細胞は  $1 \times 10^4$  cells/well で 6 well 細胞培養プレートに播種した。48、96 時間後のインキュベート後、トリパンブルーを用いて細胞数を測定した。細胞増殖率は各時間の細胞数を最初に播種した細胞数で除することで計算した。

#### 【9】肺転移モデルマウスの作製

懸濁状の colon26 細胞  $1.5 \times 10^4$  個とこの細胞数に相当する細胞数を含む colon26 細胞スフェロイドをマウス尾静脈より移植後、21 日後に肺を摘出し、肺湿重量を測定した。ここで用いた small、medium サイズの colon26 細胞スフェロイド数は、それぞれ 17 個、7 個であった。また、同様に別途作製した肺転移モデルマウスに、気管支より墨汁を投与することで、転移結節を可視化した。

さらに、肺転移巣形成効率を評価することを目的に、移植する細胞数を変えて同様の検討を行った。懸濁上の colon26 細胞  $1.5 \times 10^4$  個、 $1.5 \times 10^5$  個をマウス尾静脈より移植する群と、small サイズの colon26 細胞スフェロイドを 3 個 (細胞数  $1.7 \times 10^3$  個相当)、9 個 (細胞数  $5 \times 10^3$  個相当)、27 個 (細胞数  $1.5 \times 10^4$  個相当) 移植する群を準備し、移植から 21 日後に肺を摘出し、肺湿重量を測定した。

#### 【10】肺の透明化による CFSE 標識 colon26 細胞の検出

組織透明化技術 CUBIC を用いて肺を透明化した[55]。まず、懸濁状の colon26 細胞ならびに colon26 細胞スフェロイドに Opti-MEM™ (Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA) で希釈した  $10 \mu\text{M}$  CFSE を添加し、で 37°C、5%  $\text{CO}_2$  で 15 分インキュベートした。細胞数  $1.5 \times 10^4$  個相当の CFSE 標識 colon26 細胞ならびに colon26 細胞スフェロイドをマウス尾静脈より移植し、2 分後に肺を摘出し、4%パラホルムアルデヒドで O/N インキュベートすることで固定した。固定した肺を、尿素、Triton X-100 (和光純薬工業、大阪、日本)、N,N,N',N'-tetrakis(2-hydroxypropyl)ethylenediamine (東京化成工業、東京、日本)を含む脂質除去液に浸透させることで、透明化を施した。透明化した肺は蛍光顕微鏡 BZ-710 (Keyence、大阪、日本)にて観察した。

#### 【11】統計学的解析

第 1 章と同様の方法で行った。

### 第 3 章 実験の部

#### 【1】試薬

低酸素応答性蛍光試薬 mono azo rhodamine (MAR) は五稜化薬社より購入した。抗 HIF-1 $\alpha$  抗体、抗 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) 抗体は Abcam 社 (CB, UK) より購入した。2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFDA) は Thermo Fisher Scientific 社より購入した。MTT 試薬は Sigma-Aldrich 社 (DA, DE) より購入した。他の試薬は第 1 章、第 2 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 M $\phi$  様細胞株 J774.1 細胞、マウス乳癌細胞株 4T1 細胞は American Type Culture Collection 社 (Rockville, MD, USA) から購入した。これら細胞は、10% 非動化 FBS、0.15% 炭酸水素ナトリウム、100 units/ml ペニシリン、100 mg/ml ストレプトマイシン、2 mM L-グルタミンを添加した RPMI 培地で、37°C、5% CO<sub>2</sub>、加湿条件下で培養した。

#### 【3】PDMS 製マイクロウェルの作製

PDMS 製マイクロウェル作製は、第 1 章と同様の方法で行った。

#### 【4】細胞スフェロイドの作製

細胞スフェロイドの作製は、第 1 章と同様の方法で行った。

#### 【5】細胞スフェロイドのサイズ、細胞数、生存率の測定

細胞スフェロイドのサイズ、細胞数、生存率の測定は、第 1 章と同様の方法で行った。J774.1 細胞スフェロイドはピペッティングにより崩壊させた。

#### 【6】J774.1 細胞スフェロイドからの TNF- $\alpha$ 産生

細胞数が  $1 \times 10^5$  個相当の懸濁状の J774.1 細胞または各サイズの J774.1 細胞スフェロイド (large; 18 個、extra large; 14 個) を 96 well 細胞培養プレートに播種し 1 時間インキュベートした。その後、Opti-MEM™ で希釈した 100  $\mu$ l の 10 ng/ml リポポリサッカライド (LPS) を添加し、37°C で 8 時間さらにインキュベートした。その後、上清を回収し、上清中に含まれる TNF- $\alpha$  濃度を OptEIA mouse TNF ELISA kit (Becton Dickinson, MA, USA) を用いて定量した。

#### 【7】Real-time PCR 法

方法は第 2 章と同様に行った。Connexin 43 のオリゴヌクレオチドプライマーには、forward

( 5'-TACCACGCCACCACCGGCCA-3' ) と reverse (5'-GGCATTTTGGCTGTCGTCAGGGAA-3')を、M-sec のオリゴヌクレオチドプライマーには、forward ( 5'-AGGAGGAGTCTGCGAAGAAGA-3' ) と reverse (5'-GGCAGTGGACCATCTAACTCG-3')を、iNOS のオリゴヌクレオチドプライマーには、forward (5'-GTTCTCAGCCCAACAATAACAAGA-3')とreverse(5'-GTGGACGGGTCGATGTCAC-3')を、CXCL10 のオリゴヌクレオチドプライマーには、forward(5'-CCAAGTGCTGCCGTCATTTTC-3')と reverse(5'-GGCTCGCAGGGATGATTTCAA-3')を、Arg-1 のオリゴヌクレオチドプライマーには、forward(5'-TGGCTTGCAGACGTAGAC-3')と reverse(5'-GCTCAGGTGAATCGGCCTTTT-3')を、Ym-1 のオリゴヌクレオチドプライマーには、forward(5'-TTATCCTGAGTGACCCTTCTAAG-3')と reverse(5'-TCATTACCCTGATAGGCATAGG-3')を、CD206 のオリゴヌクレオチドプライマーには、forward(5'-CCCAAGGGCTCTTCTAAAGCA-3')と reverse(5'-CGCCGGCACCTATCACA-3')を、GAPDH のオリゴヌクレオチドプライマーには、forward(5'-AGGTCGGTGTGAACGGATTTG-3')と reverse(5'-TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA-3')を利用した。DNA 増幅条件として、95°C 3 秒、60°C 15 秒、72°C 15 秒を 40 サイクル繰り返した。標的遺伝子の mRNA 発現に対する相対定量時の標準として、GAPDH を用いた。対照群として、M1 型 J774.1 細胞の場合、インターフェロン(IFN)  $\gamma$  50 ng/mL と LPS 10 ng/ml を、M2 型 J774.1 細胞の場合、IL-4 20 ng/ml をそれぞれ含む RPMI 培地で 24 時間培養することで M $\phi$  の分化を誘導した。

#### 【8】低酸素領域の観察

ジメチルスルホキシド(DMSO)を用いて希釈した 1  $\mu$ M MAR を含む RPMI 培地を用意し、J774.1 細胞を通常大気圧下もしくはアネロパック(三菱ガス化学、東京、日本)で誘導した低酸素環境で、37°C で 6 時間培養した。同様にマイクロウェル基板に入った状態で、MAR 溶液を添加し、通常大気圧下で 37°C で 6 時間培養した。最後に、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)で洗浄後、BZ-710 で蛍光観察を行った。

#### 【9】HIF-1 $\alpha$ のタンパク質のウェスタンブロット法による検出

50 mM トリスヒドロキシメチルアミノメタン、150 mM 塩化ナトリウム、1% NP-40、0.5% デオキシコール酸ナトリウム、0.1% ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、プロテアーゼ阻害剤カクテル(ナカライテスク)から成る細胞溶解液を用いて、懸濁状の J774.1 細胞または extra large サイズの J774.1 細胞スフェロイドからタンパク質を抽出した。1M ジチオスレイトールでタンパク質を変性後、10%ポリアクリルアミドゲルを用いて SDS-PAGE 電気泳動を行った。ポリフッ化ビニリデン膜への転写後、Blocking One(ナカライテスク、京都、日本)を用いて 30 分間のブロッキングを行った。次に、抗 HIF-1 $\alpha$  抗体(1,000 倍希釈)、もしくは抗 GAPDH 抗体(10,000 倍希釈)を用いて一次抗体処理を行い、続いて HRP 標識二次抗体(2,000 倍希釈)処理し、Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate(Merck Millipore, MA, USA)を添加後、LAS-3000(富士フィルム、東京、日本)で



観察を行った。得られたタンパク質由来のバンド画像より、画像処理ソフト ImageJ を用い、画像解析を行うことでバンド強度を定量化した。

#### 【10】活性酸素種 (ROS) 由来の蛍光強度の検出

HBSS で希釈した 25  $\mu$ M DCFDA で J774.1 細胞を処理後、スフェロイド化を行った。72 時間の培養後、ピペッティングで J774.1 細胞スフェロイドを崩壊させ、得た懸濁液を 4% PFA で 15 分間氷上で固定し、用いてフローサイトメーター Gallios (Beckman Coulter Inc., CA, USA) を用いて、ROS 由来の蛍光強度解析を行った。対照群として、アネロパックで誘導した低酸素環境で単層培養した J774.1 細胞を同様に準備した。

#### 【11】癌細胞増殖抑制効果の評価

トランズウェルのチャンバー下部である 12 well 細胞培養プレートに colon26 細胞ならびに 4T1 細胞  $5 \times 10^4$  個を播種し、チャンバー上部に懸濁状の J774.1 細胞または extra large サイズの J774.1 細胞スフェロイドを細胞数が約  $1 \times 10^5$  個となるように播種した。培養を行う RPMI 培地には 10 ng/ml LPS を添加した。37°C、5% CO<sub>2</sub> で 48 時間培養後、チャンバー下部の癌細胞数を MTT 法を用いて測定した。

#### 【12】統計学的解析

第 1 章と同様の方法で行った。

### 第 4 章 実験の部

#### 【1】試薬

Cell Tracker™ Red CMTPX は Thermo Fisher Scientific 社より購入した。WST8 アッセイに用いる生細胞数測定試薬 SF はナカライテスクより購入した。他の試薬は、第 1 章から第 3 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

Colon26 細胞の培養は第 2 章と同様に行った。

#### 【3】実験動物

腹腔 M $\phi$  の回収のために 5-8 週齢の BALB/c 系雄性マウスを、担癌モデルマウスの作製のために 6 週齢の BALB/c 系雌性マウスをそれぞれ日本 SLC 株式会社 (静岡、日本) より購入した。購入したマウスは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】M2 型腹腔 M $\phi$ の誘導

4% チオグリコレート培地をマウス腹腔に投与し、4 日後 4ml PBS をマウス腹腔に投与後 2 分程度の腹部マッサージし、PBS を回収した。回収した PBS を 300 g で 10 分間遠心することで腹腔 M $\phi$  を得た。得られた腹腔 M $\phi$  を 15 cm dish に播種し 1~2 時間後、20 ng/ml の IL-4 を添加した RPMI 培地で 24 時間培養することで、M2 型への誘導を行った。誘導した M2 型腹腔 M $\phi$  は 0.1 M リドカインを用いて剥離し以降の検討に用いた。

#### 【5】PDMS 製マイクロウェルの作製

PDMS 製マイクロウェルは、第 1 章と同様の方法で作製し実験に用いた。

#### 【6】細胞スフェロイドの作製

基本的には第 1 章と同様の方法で作製したが、large サイズのマイクロウェル基板を使用し、播種する総細胞数を  $2 \times 10^6$  個とした。播種する細胞個合比を colon26 細胞:M2 型腹腔 M $\phi$  が 1:0、1:1、1:2、1:3 となるように調節することで、4 種類の colon26 細胞スフェロイド並びに混合細胞スフェロイドを作製した。

#### 【7】細胞スフェロイドのサイズ、細胞数、生存率の測定

細胞スフェロイドのサイズ、細胞数、生存率の測定は、第 1 章と同様の方法で行った。

#### 【8】colon26 細胞/M2 型腹腔 M $\phi$ からなる混合細胞スフェロイドの細胞分布

混合細胞スフェロイドにおける colon26 細胞と M2 型 M $\phi$  の分布を明らかにするために、Cell Tracker™ Red CMTPX で colon26 細胞を、CFSE で M2 型 M $\phi$  を標識した。これらの細胞を用いて、上記と同様な方法で混合細胞スフェロイドを作製した。得られた蛍光標識細胞スフェロイドは、蛍光顕微鏡 BZ-710 を利用して観察した。

#### 【9】フローサイトメリーによる細胞スフェロイドの細胞構成比の解析

上記と同様な方法で作製した蛍光標識細胞スフェロイドをトリプシンにより均一に懸濁した。得られた懸濁液を用いて、フローサイトメーター Gallios にて、各細胞由来の蛍光強度解析を行った。

#### 【10】肺の透明化による蛍光標識混合細胞スフェロイドの検出

上記と同様な方法で作製した蛍光標識細胞スフェロイドを使用し、肺に塞栓した混合細胞スフェロイドの顕微鏡観察を行った。肺の透明化は第 2 章と同様の方法で行った。

#### 【11】担癌モデルマウスの作製

担癌モデルマウスの作製には、M2 型腹腔 M $\phi$  の影響がでやすいと考えられる colon26 細胞と M2 型腹腔 M $\phi$  を 1:3 の割合で播種したものを使用した。肺転移モデルマウスの作製は第 2 章とほ

ば同様の方法で行った。肺の摘出は移植後 16 日後とした。

また、皮下腫瘍形成効率を評価することを目的に、懸濁状の colon26 細胞  $1 \times 10^4$  個とこの細胞数に相当する細胞数を含む colon26 細胞スフェロイドをマウス背部皮下に移植後、経時的に 28 日間腫瘍サイズを測定した。ここで用いた colon26 単独の細胞スフェロイドと混合細胞スフェロイドのスフェロイド数は、それぞれ 4 個、16 個であった。

#### 【12】*In vitro* における細胞増殖の評価

Colon26 細胞単独のスフェロイドと混合細胞スフェロイドそれぞれ 1 つを 96 well 細胞培養プレートに播種後、顕微鏡を用いて経時的に形態観察を行った。また、別途同じく各種細胞スフェロイドを準備し、WST8 アッセイを製品プロトコルに準じて行った。

#### 【13】統計学的解析

第 1 章と同様の方法で行った。

## 引用文献

1. Takayama K, Kawabata K, Nagamoto Y, Kishimoto K, Tashiro K, Sakurai F, et al. 3D spheroid culture of hESC/hiPSC-derived hepatocyte-like cells for drug toxicity testing. *Biomaterials* 2013;34:1781-1789.
2. Sakai Y, Tanaka T, Fukuda J, Nakazawa K. Alkoxyresorufin O-dealkylase assay using a rat hepatocyte spheroid microarray. *Journal of bioscience and bioengineering* 2010;109:395-399.
3. Torisawa Y, Takagi A, Nashimoto Y, Yasukawa T, Shiku H, Matsue T. A multicellular spheroid array to realize spheroid formation, culture, and viability assay on a chip. *Biomaterials* 2007;28:559-566.
4. Vinci M, Gowan S, Boxall F, Patterson L, Zimmermann M, Court W, et al. Advances in establishment and analysis of three-dimensional tumor spheroid-based functional assays for target validation and drug evaluation. *BMC Biology* 2012;10:29-7007-10-29.
5. Godugu C, Patel AR, Desai U, Andey T, Sams A, Singh M. AlgiMatrix™ based 3D cell culture system as an in-vitro tumor model for anticancer studies. *PLoS One* 2013;8:e53708.
6. Lee DW, Choi Y, Seo YJ, Lee M, Jeon SY, Ku B, et al. High-throughput screening (HTS) of anticancer drug efficacy on a micropillar/microwell chip platform. *Analytical Chemistry* 2013;86:535-542.
7. Krohn A, Song Y, Muehlberg F, Droll L, Beckmann C, Alt E. CXCR4 receptor positive spheroid forming cells are responsible for tumor invasion in vitro. *Cancer Letters* 2009;280:65-71.
8. Okochi M, Takano S, Isaji Y, Senga T, Hamaguchi M, Honda H. Three-dimensional cell culture array using magnetic force-based cell patterning for analysis of invasive capacity of BALB/3T3/v-src. *Lab on a chip* 2009;9:3378-3384.
9. Kusamori K, Nishikawa M, Mizuno N, Nishikawa T, Masuzawa A, Shimizu K, et al. Transplantation of insulin-secreting multicellular spheroids for the treatment of type 1 diabetes in mice. *Journal of Controlled Release* 2014;173:119-124.
10. Jun Y, Kang AR, Lee JS, Jeong GS, Ju J, Lee DY, et al. 3D co-culturing model of primary pancreatic islets and hepatocytes in hybrid spheroid to overcome pancreatic cell shortage. *Biomaterials* 2013;34:3784-3794.

11. Bhang SH, Cho S, La W, Lee T, Yang HS, Sun A, et al. Angiogenesis in ischemic tissue produced by spheroid grafting of human adipose-derived stromal cells. *Biomaterials* 2011;32:2734-2747.
12. Mironov V, Visconti RP, Kasyanov V, Forgacs G, Drake CJ, Markwald RR. Organ printing: tissue spheroids as building blocks. *Biomaterials* 2009;30:2164-2174.
13. Jakab K, Norotte C, Damon B, Marga F, Neagu A, Besch-Williford CL, et al. Tissue engineering by self-assembly of cells printed into topologically defined structures. *Tissue Engineering Part A* 2008;14:413-421.
14. Shimizu K, Kusamori K, Nishikawa M, Mizuno N, Nishikawa T, Masuzawa A, et al. Poly (N-isopropylacrylamide)-coated microwell arrays for construction and recovery of multicellular spheroids. *Journal of bioscience and bioengineering* 2013;115:695-699.
15. Anada T, Fukuda J, Sai Y, Suzuki O. An oxygen-permeable spheroid culture system for the prevention of central hypoxia and necrosis of spheroids. *Biomaterials* 2012;33:8430-8441.
16. Glicklis R, Merchuk JC, Cohen S. Modeling mass transfer in hepatocyte spheroids via cell viability, spheroid size, and hepatocellular functions. *Biotechnology and Bioengineering* 2004;86:672-680.
17. Curcio E, Salerno S, Barbieri G, De Bartolo L, Drioli E, Bader A. Mass transfer and metabolic reactions in hepatocyte spheroids cultured in rotating wall gas-permeable membrane system. *Biomaterials* 2007;28:5487-5497.
18. Mueller-Klieser W, Freyer JP, Sutherland RM. Influence of glucose and oxygen supply conditions on the oxygenation of multicellular spheroids. *British Journal of Cancer* 1986;53:345-353.
19. Semenza GL. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *Journal of Applied Physiology* (1985) 2000;88:1474-1480.
20. Tamura T, Sakai Y, Nakazawa K. Two-dimensional microarray of HepG2 spheroids using collagen/polyethylene glycol micropatterned chip. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 2008;19:2071-2077.

21. Sakai Y, Nakazawa K. Technique for the control of spheroid diameter using microfabricated chips. *Acta biomaterialia* 2007;3:1033-1040.
22. Jeschke MG. The hepatic response to thermal injury: is the liver important for postburn outcomes? *Molecular Medicine* 2009;15.
23. Vakharia DD, Liu N, Pause R, Fasco M, Bessette E, Zhang QY, et al. Polycyclic aromatic hydrocarbon/metal mixtures: effect on PAH induction of CYP1A1 in human HEPG2 cells. *Drug Metabolism & Disposition* 2001;29:999-1006.
24. Fukuda J, Okamura K, Nakazawa K, Ijima H, Yamashita Y, Shimada M, et al. Efficacy of a polyurethane foam/spheroid artificial liver by using human hepatoblastoma cell line (Hep G2). *Cell Transplantation* 2003;12:51-58.
25. Tannock IF, Kopelyan I. Influence of glucose concentration on growth and formation of necrosis in spheroids derived from a human bladder cancer cell line. *Cancer Research* 1986;46:3105-3110.
26. Chang TT, Hughes-Fulford M. Monolayer and spheroid culture of human liver hepatocellular carcinoma cell line cells demonstrate distinct global gene expression patterns and functional phenotypes. *Tissue Engineering Part A* 2008;15:559-567.
27. Kirsch RE, Saunders SJ, Frith L, Wicht S, Kelman L, Brock JF. Plasma amino acid concentration and the regulation of albumin synthesis. *The American Journal of Clinical Nutrition* 1969;22:1559-1562.
28. John DW, Miller LL. Regulation of net biosynthesis of serum albumin and acute phase plasma proteins. Induction of enhanced net synthesis of fibrinogen, alpha1-acid glycoprotein, alpha2 (acute phase)-globulin, and haptoglobin by amino acids and hormones during perfusion of the isolated normal rat liver. *The Journal of Biological Chemistry* 1969;244:6134-6142.
29. Morgan EH, Peters T, Jr. The biosynthesis of rat serum albumin. V. Effect of protein depletion and refeeding on albumin and transferrin synthesis. *The Journal of Biological Chemistry* 1971;246:3500-3507.
30. Grant AG, Hoffenberg R. The effect of dietary protein deprivation on protein synthesis in the isolated liver parenchymal cell. *British Journal of Nutrition* 1977;38:255-260.

31. Hoffenberg R, Gordon A, Black E. Albumin synthesis by the perfused rat liver. A comparison of methods with special reference to the effect of dietary protein deprivation. *Biochemical Journal* 1971;122:129-134.
32. Smith J, Lunn P. Albumin-synthesizing capacity of hepatocytes isolated from rats fed diets differing in protein and energy content. *Annals of nutrition and metabolism* 1984;28:281-287.
33. Matsushita T, Nakano K, Nishikura Y, Higuchi K, Kiyota A, Ueoka R. Spheroid formation and functional restoration of human fetal hepatocytes on poly-amino acid-coated dishes after serial proliferation. *Cytotechnology* 2003;42:57-66.
34. Terashima J, Goto S, Hattori H, Hoshi S, Ushirokawa M, Kudo K, et al. CYP1A1 and CYP1A2 expression levels are differentially regulated in three-dimensional spheroids of liver cancer cells compared to two-dimensional monolayer cultures. *Drug metabolism and pharmacokinetics* 2015;30:434-440.
35. Okamoto T, Mitsuhashi M, Fujita I, Sindhu RK, Kikkawa Y. Induction of cytochrome P450 1A1 and 1A2 by hyperoxia. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1993;197:878-885.
36. Johnson JI, Decker S, Zaharevitz D, Rubinstein LV, Venditti JM, Schepartz S, et al. Relationships between drug activity in NCI preclinical in vitro and in vivo models and early clinical trials. *British Journal of Cancer* 2001;84:1424-1431.
37. Teicher BA, Herman TS, Holden SA, Wang YY, Pfeffer MR, Crawford JW, et al. Tumor resistance to alkylating agents conferred by mechanisms operative only in vivo. *Science* 1990;247:1457-1461.
38. Khaitan D, Chandna S, Arya MB, Dwarakanath BS. Establishment and characterization of multicellular spheroids from a human glioma cell line; Implications for tumor therapy. *Journal of Translational Medicine* 2006;4:12.
39. Kim JB. Three-dimensional tissue culture models in cancer biology. *Seminars in Cancer Biology* 2005;15:365-377.
40. Griffith LG, Swartz MA. Capturing complex 3D tissue physiology in vitro. *Nature reviews Molecular cell biology* 2006;7:211-224.

41. Pampaloni F, Reynaud EG, Stelzer EH. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nature reviews Molecular cell biology* 2007;8:839-845.
42. Abbott A. Cell culture: biology's new dimension. *Nature* 2003;424:870-872.
43. Mueller-Klieser W. Tumor biology and experimental therapeutics. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 2000;36:123-139.
44. Hamer PDW, Van Tilborg A, Eijk P, Sminia P, Troost D, Van Noorden C, et al. The genomic profile of human malignant glioma is altered early in primary cell culture and preserved in spheroids. *Oncogene* 2008;27:2091-2096.
45. Sakai Y, Yamagami S, Nakazawa K. Comparative analysis of gene expression in rat liver tissue and monolayer- and spheroid-cultured hepatocytes. *Cells Tissues Organs* 2010;191:281-288.
46. Schwachofer JH. Multicellular tumor spheroids in radiotherapy research (review). *AntiCancer Research* 1990;10:963-969.
47. Zhang X, Wang W, Yu W, Xie Y, Zhang X, Zhang Y, et al. Development of an in vitro multicellular tumor spheroid model using microencapsulation and its application in anticancer drug screening and testing. *Biotechnology Progress* 2005;21:1289-1296.
48. Guo WM, Loh XJ, Tan EY, Loo JS, Ho VH. Development of a magnetic 3D spheroid platform with potential application for high-throughput drug screening. *Molecular pharmaceutics* 2014;11:2182-2189.
49. Ivanov DP, Parker TL, Walker DA, Alexander C, Ashford MB, Gellert PR, et al. Multiplexing spheroid volume, resazurin and acid phosphatase viability assays for high-throughput screening of tumour spheroids and stem cell neurospheres. *PloS one* 2014;9:e103817.
50. Cheng V, Esteves F, Chakrabarty A, Cockle J, Short S, Brüning-Richardson A. High-content analysis of tumour cell invasion in three-dimensional spheroid assays. *Oncoscience* 2015;2:596.
51. Foster TH, Hartley DF, Nichols MG, Hilf R. Fluence rate effects in photodynamic therapy of multicell tumor spheroids. *Cancer Research* 1993;53:1249-1254.
52. Steinbach P, Wedmgandt H, Baumgartner R, Kriegmair M, Hofstädter F, Knüchel R. CELLULAR FLUORESCENCE OF THE ENDOGENOUS PHOTOSENSITIZER



PROTOPORPHYRIN IX FOLLOWING EXPOSURE TO 5-AMINOLEVULINIC ACID.

Photochemistry and Photobiology 1995;62:887-895.

53. Iwasaki K, Kikuchi H, Miyatake S, Aoki T, Yamasaki T, Oda Y. Infiltrative and cytolytic activities of lymphokine-activated killer cells against a human glioma spheroid model. *Cancer Research* 1990;50:2429-2436.

54. Jaaskelainen J, Kalliomaki P, Paetau A, Timonen T. Effect of LAK cells against three-dimensional tumor tissue. In vitro study using multi-cellular human glioma spheroids as targets. *The Journal of Immunology* 1989;142:1036-1045.

55. Susaki EA, Tainaka K, Perrin D, Yukinaga H, Kuno A, Ueda HR. Advanced CUBIC protocols for whole-brain and whole-body clearing and imaging. *Nature protocols* 2015;10:1709-1727.

56. Schrepfer S, Deuse T, Reichenspurner H, Fischbein M, Robbins R, Pelletier M. Stem cell transplantation: the lung barrier. *Transplantation Proceedings* 2007;39:573-576.

57. Fischer UM, Harting MT, Jimenez F, Monzon-Posadas WO, Xue H, Savitz SI, et al. Pulmonary passage is a major obstacle for intravenous stem cell delivery: the pulmonary first-pass effect. *Stem cells and development* 2009;18:683-692.

58. Eggenhofer E, Benseler V, Kroemer A, Popp F, Geissler E, Schlitt H, et al. Mesenchymal stem cells are short-lived and do not migrate beyond the lungs after intravenous infusion. *Mesenchymal stem cells in Transplantation and Tissue Regeneration* 2013:60.

59. Fidler IJ. Metastasis: quantitative analysis of distribution and fate of tumor emboli labeled with 125 I-5-iodo-2'-deoxyuridine. *Journal of the National Cancer Institute* 1970;45:773-782.

60. Honn KV, Tang DG. Adhesion molecules and tumor cell interaction with endothelium and subendothelial matrix. *Cancer and Metastasis Reviews* 1992;11:353-375.

61. Fujisaki T, Tanaka Y, Fujii K, Mine S, Saito K, Yamada S, et al. CD44 stimulation induces integrin-mediated adhesion of colon cancer cell lines to endothelial cells by up-regulation of integrins and c-Met and activation of integrins. *Cancer Research* 1999;59:4427-4434.

62. Creighton C, Kuick R, Misek DE, Rickman DS, Brichory FM, Rouillard J, et al. Profiling of pathway-specific changes in gene expression following growth of human cancer cell lines transplanted into mice. *Genome Biology* 2003;4:R46.

63. Stein WD, Litman T, Fojo T, Bates SE. A Serial Analysis of Gene Expression (SAGE) database analysis of chemosensitivity: comparing solid tumors with cell lines and comparing solid tumors from different tissue origins. *Cancer Research* 2004;64:2805-2816.
64. Chakravarti D, Wong WW. Synthetic biology in cell-based cancer immunotherapy. *Trends in Biotechnology* 2015;33:449-461.
65. Nicol AJ, Tokuyama H, Mattarollo SR, Hagi T, Suzuki K, Yokokawa K, et al. Clinical evaluation of autologous gamma delta T cell-based immunotherapy for metastatic solid tumours. *British Journal of Cancer* 2011;105:778-786.
66. Fong L, Engleman EG. Dendritic cells in cancer immunotherapy. *Annual Review of Immunology* 2000;18:245-273.
67. Jensen JL, Rakhmilevich A, Heninger E, Broman AT, Hope C, Phan F, et al. Tumoricidal Effects of Macrophage-activating Immunotherapy in a Murine Model of Relapsed/Refractory Multiple Myeloma. *Cancer immunology research* 2015;canimm. 0025.2015.
68. Senju S, Koba C, Haruta M, Matsunaga Y, Matsumura K, Haga E, et al. Application of iPS cell-derived macrophages to cancer therapy. *Oncoimmunology* 2014;3:e27927.
69. Lachmann N, Ackermann M, Frenzel E, Liebhaber S, Brenning S, Happle C, et al. Large-Scale Hematopoietic Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells Provides Granulocytes or Macrophages for Cell Replacement Therapies. *Stem Cell Reports* 2015;4:282-296.
70. Sinha P, Clements VK, Ostrand-Rosenberg S. Reduction of myeloid-derived suppressor cells and induction of M1 macrophages facilitate the rejection of established metastatic disease. *The Journal of Immunology* 2005;174:636-645.
71. Qian B, Pollard JW. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell* 2010;141:39-51.
72. Komohara Y, Jinushi M, Takeya M. Clinical significance of macrophage heterogeneity in human malignant tumors. *Cancer science* 2014;105:1-8.
73. Bak SP, Walters JJ, Takeya M, Conejo-Garcia JR, Berwin BL. Scavenger receptor-A-targeted leukocyte depletion inhibits peritoneal ovarian tumor progression. *Cancer Research* 2007;67:4783-4789.

74. Nagai T, Tanaka M, Tsuneyoshi Y, Xu B, Michie SA, Hasui K, et al. Targeting tumor-associated macrophages in an experimental glioma model with a recombinant immunotoxin to folate receptor  $\beta$ . *Cancer immunology, immunotherapy* 2009;58:1577-1586.
75. Xu M, Liu M, Du X, Li S, Li H, Li X, et al. Intratumoral delivery of IL-21 overcomes anti-Her2/Neu resistance through shifting tumor-associated macrophages from M2 to M1 phenotype. *The Journal of Immunology* 2015;194:4997-5006.
76. Shime H, Matsumoto M, Oshiumi H, Tanaka S, Nakane A, Iwakura Y, et al. Toll-like receptor 3 signaling converts tumorsupporting myeloid cells to tumoricidal effectors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2012;109:2066-2071.
77. Sousa S, Auriola S, Mönkkönen J, Määttä J. Liposome encapsulated zoledronate favours M1-like behaviour in murine macrophages cultured with soluble factors from breast cancer cells. *BMC Cancer* 2015;15.
78. Kusamori K, Nishikawa M, Mizuno N, Nishikawa T, Masuzawa A, Tanaka Y, et al. Increased Insulin Secretion from Insulin-Secreting Cells by Construction of Mixed Multicellular Spheroids. *Pharmaceutical Research* 2015:1-10.
79. Korbitt GS, Elliott JF, Rajotte RV. Cotransplantation of allogeneic islets with allogeneic testicular cell aggregates allows long-term graft survival without systemic immunosuppression. *Diabetes* 1997;46:317-322.
80. Bartosh TJ, Ylöstalo JH, Mohammadipoor A, Bazhanov N, Coble K, Claypool K, et al. Aggregation of human mesenchymal stromal cells (MSCs) into 3D spheroids enhances their antiinflammatory properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2010;107:13724-13729.
81. Reynolds BA, Rietze RL. Neural stem cells and neurospheres - Re-evaluating the relationship. *Nature Methods* 2005;2:333-336.
82. Rama-Esendagli D, Esendagli G, Yilmaz G, Guc D. Spheroid formation and invasion capacity are differentially influenced by co-cultures of fibroblast and macrophage cells in breast cancer. *Molecular Biology Reports* 2014;41:2885-2892.
83. Beyer EC, Steinberg TH. Evidence that the gap junction protein connexin-43 is the ATP-induced pore of mouse macrophages. *The Journal of Biological Chemistry* 1991;266:7971-7974.

84. Hase K, Kimura S, Takatsu H, Ohmae M, Kawano S, Kitamura H, et al. M-Sec promotes membrane nanotube formation by interacting with Ral and the exocyst complex. *Nature Cell Biology* 2009;11:1427-1432.
85. Ilvesaro J, Väänänen K, Tuukkanen J. Bone-resorbing osteoclasts contain gap-junctional connexin-43. *Journal of Bone and Mineral Research* 2000;15:919-926.
86. Hirschhaeuser F, Menne H, Dittfeld C, West J, Mueller-Klieser W, Kunz-Schughart LA. Multicellular tumor spheroids: an underestimated tool is catching up again. *Journal of Biotechnology* 2010;148:3-15.
87. Khaitan D, Dwarakanath BS. Endogenous and induced oxidative stress in multi-cellular tumour spheroids: implications for improving tumour therapy. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics* 2009;46:16-24.
88. Folco EJ, Sukhova GK, Quillard T, Libby P. Moderate hypoxia potentiates interleukin-1beta production in activated human macrophages. *Circulation Research* 2014;115:875-883.
89. Kim SY, Choi YJ, Joung SM, Lee BH, Jung Y, Lee JY. Hypoxic stress up-regulates the expression of Toll-like receptor 4 in macrophages via hypoxia-inducible factor. *Immunology* 2010;129:516-524.
90. Werno C, Menrad H, Weigert A, Dehne N, Goerdts S, Schledzewski K, et al. Knockout of HIF-1alpha in tumor-associated macrophages enhances M2 polarization and attenuates their pro-angiogenic responses. *Carcinogenesis* 2010;31:1863-1872.
91. Takeda N, O'Dea EL, Doedens A, Kim JW, Weidemann A, Stockmann C, et al. Differential activation and antagonistic function of HIF-1{alpha} isoforms in macrophages are essential for NO homeostasis. *Genes & Development* 2010;24:491-501.
92. Quail DF, Joyce JA. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nature Medicine* 2013;19:1423-1437.
93. Chanmee T, Ontong P, Konno K, Itano N. Tumor-associated macrophages as major players in the tumor microenvironment. *Cancers* 2014;6:1670-1690.
94. Lewis CE, Pollard JW. Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. *Cancer Research* 2006;66:605-612.

95. Alleva DG, Burger CJ, Elgert KD. Tumor-induced regulation of suppressor macrophage nitric oxide and TNF-alpha production. Role of tumor-derived IL-10, TGF-beta, and prostaglandin E2. *The Journal of Immunology* 1994;153:1674-1686.
96. Parajuli P, Singh S, Kumar A, Sodhi A. Alterations in the tumoricidal functions of murine tumor-associated macrophages during progressive growth of a tumor in vivo. *The Cancer journal* 1997;10:222-228.
97. Zhang Q, Liu L, Gong C, Shi H, Zeng Y, Wang X, et al. Prognostic significance of tumor-associated macrophages in solid tumor: a meta-analysis of the literature. *PloS one* 2012;7:e50946.
98. Lahmar Q, Keirsse J, Laoui D, Movahedi K, Van Overmeire E, Van Ginderachter JA. Tissue-resident versus monocyte-derived macrophages in the tumor microenvironment. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer* 2016;1865:23-34.
99. Duluc D, Delneste Y, Tan F, Moles MP, Grimaud L, Lenoir J, et al. Tumor-associated leukemia inhibitory factor and IL-6 skew monocyte differentiation into tumor-associated macrophage-like cells. *Blood* 2007;110:4319-4330.
100. Tsukano H, Gotoh T, Endo M, Miyata K, Tazume H, Kadomatsu T, et al. The endoplasmic reticulum stress-C/EBP homologous protein pathway-mediated apoptosis in macrophages contributes to the instability of atherosclerotic plaques. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2010;30:1925-1932.
101. Torisu H, Ono M, Kiryu H, Furue M, Ohmoto Y, Nakayama J, et al. Macrophage infiltration correlates with tumor stage and angiogenesis in human malignant melanoma: Possible involvement of TNF $\alpha$  and IL-1 $\alpha$ . *International journal of cancer* 2000;85:182-188.
102. Duong T, Koopman P, Francois M. Tumor lymphangiogenesis as a potential therapeutic target. *Journal of oncology* 2012;2012.
103. Ran S, Montgomery KE. Macrophage-mediated lymphangiogenesis: the emerging role of macrophages as lymphatic endothelial progenitors. *Cancers* 2012;4:618-657.
104. Wyckoff J, Wang W, Lin EY, Wang Y, Pixley F, Stanley ER, et al. A paracrine loop between tumor cells and macrophages is required for tumor cell migration in mammary tumors. *Cancer Research* 2004;64:7022-7029.

105. Gras Navarro A, Björklund AT, Chekenya M. Therapeutic potential and challenges of natural killer cells in treatment of solid tumors. *Frontiers in immunology* 2015;6:202.