

(別紙1)

総括研究報告書

課題番号：2019C-11

課題名：神経芽腫に対する3D神経-血管培養評価システムの構築と小児医療への展開

主任研究者 (所属施設) 国立研究開発法人国立成育医療研究センター・研究所
(所属・職名 氏名) 再生医療センター細胞医療研究部・上級研究員 宮本義孝

(研究成果の要約)

本研究の目的は、「小児期にできる神経芽腫に対して、3D培養による細胞挙動から評価システムを構築する」ことである。特に、生体内を模倣した3D神経-血管評価モデルが構築できれば、小児疾患の病態メカニズムの解明につながる可能性を秘めている。そこで、本研究では、神経芽腫に注目し、①細胞凝集塊の形成と細胞外マトリックス内での挙動、②3D神経-血管培養評価システムの構築について検証する。

我々は、細胞の機能や細胞集団としての特性をより生体内での状態に近づけるために、スクリーニング用腫瘍モデル、細胞凝集塊を形成させる三次元培養デバイス(TASCL: Tapered Stencil for Cluster Culture)を作製し、大量に細胞凝集塊を生産することに成功した。さらに、任意の細胞凝集塊を選択的に回収する自動培養システム(PASCL)から遺伝子発現解析システムを構築した。

作製したTASCLデバイスを用いて、ヒト神経芽細胞腫(NB-1株)による細胞凝集塊を大量に生産することに成功した。特に、細胞播種数に比例して、球状の細胞凝集塊は大きくなり(φ50-200μm)、各々の細胞凝集塊の大きさも均一かつ高い形成率を示した。さらに、セルカルチャーインサート(高分子多孔質膜)上にTASCLを設置することで、細胞凝集塊の低酸素状態を減少させ、品質の良い細胞凝集塊を生産することができた。

続いて、生体内の主要な細胞外マトリックスの一つであるコラーゲン内にヒト神経芽細胞腫の細胞凝集塊を包埋し、その挙動を検討した。結果、各々の細胞凝集塊の大きさ(φ50-200μm)に対して、コラーゲングル内での細胞凝集塊の細胞増殖とその挙動には差は見られなかった。さらに、培養チップの各々のチャンネルに、ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)のモノレイヤー(血管構築物)と、I型コラーゲングル内に包埋したヒト神経芽細胞腫(NB-1株)の細胞凝集塊を作製することで、3D神経-血管培養評価モデルを構築することができた。将来的に、本モデルを用いた創薬スクリーニングへの展開が期待される。

1. 研究目的

本研究の目的は、「小児期にできる神経芽腫に対して、3D培養による細胞挙動から評価システムを構築する」ことである。特に、生体内を模倣した3D神経-血管評価モデルが構築できれば、小児疾患の病態メカニズムの解明につながる可能性を秘めている。

また、本研究開発の進展は、神経芽腫における抗がん剤スクリーニング、および治療戦略が抱える種々の医学的、経済的、社会的問題の改善に寄与し、国民の医療水準の向上に多大な貢献をなすこととなる。

そこで、本研究では、ヒト神経芽細胞腫に注目し、①マイクロデバイスによる細胞凝集塊の形成と細胞外マトリックス内での挙

動、②3D神経-血管培養評価システムの構築について検証した。

2. 研究組織

研究者	所属施設
宮本 義孝	国立成育医療研究センター
宮戸 健二	国立成育医療研究センター
康 宇鎮	国立成育医療研究センター
	研究協力者
梅澤 明弘	国立成育医療研究センター

3. 研究成果

本年度の研究では、2Dおよび3D培養技術による3D神経-血管培養評価システムの構築を行った。特に、がん細胞は基底膜を破

壊し、さらに間質の細胞外マトリクス (ECM) 内を移動して進み、血管やリンパ管内へと侵入していく (浸潤)。1) ~ 3) では、マイクロデバイスの作製、がん細胞凝集塊 (神経芽細胞腫など) の形成、ECM (コラーゲンゲル) 内での挙動について検討した。4) では、培養チップの各々のチャンネルに、「3D 血管」と「ECM ゲルに包埋した神経芽細胞腫凝集塊」を作製し、3D 神経-血管培養評価モデルの構築とそのメカニズムの解明に取り組んだ。

1) マイクロデバイスの作製と評価

我々は、細胞の機能や細胞集団としての特性をより生体内での状態に近づけるために、スクリーニング用腫瘍モデル、細胞凝集塊を形成させる三次元培養デバイス (TASCL: Tapered Stencil for Cluster Culture) を作製し、大量に細胞凝集塊を生産することに成功した。

TASCL デバイスは、PDMS (ポリジメチルシロキサン) シート上に所定の形状の貫通孔を多数配置して、貫通孔の壁面は上部から下部に向かうテーパとする。デバイス表面は、水平面は全く存在せず、親水化処理を施し、細胞を播種すると、必ず各々の貫通孔の底面に向かって沈降する。すなわち、一度の細胞播種操作で、培養基材上で制御された細胞数及び密度条件下での細胞凝集塊を大量に生産することができる。

さらに、任意の細胞凝集塊を選択的に回収する自動培養システム (PASCL) から遺伝子発現解析システムを構築した (池内真志、宮本義孝、木村雄亮。マイクロデバイス技術がもたらす三次元培養の新展開。患者由来がんモデルを用いたがん研究実践ガイド。羊土社 (実験医学別冊)。2019 年 10 月。pp. 77-82)。

2) ヒト神経芽細胞腫の細胞凝集塊の形成と生産

作製した TASCL デバイスを用いて、ヒト神経芽細胞腫 (NB-1 株) による細胞凝集塊を大量に生産することに成功した。また、細胞播種数に比例して、球状の細胞凝集塊は大きくなり (ϕ 50-200 μ m)、各々の細胞凝集塊の大きさも均一かつ高い形成率を示した。

さらに、従来の低接着性培養基材からセルカルチャーインサート (高分子多孔質膜) 上に TASCL を設置することで、細胞凝集塊の低酸素状態を減少させ (低酸素応答性蛍光プローブによる評価)、品質の良い細胞凝集塊を生産することができた。

従来の培養基材では、ウェル内の細胞凝集塊の培地の交換不足等により内側の細胞が壊死してしまう。一方、セルカルチャーインサートに変更することにより、細胞凝集塊に対して、微小孔を通じてウェル上下からガスおよび培地拡散を促進し、細胞壊死を減少させることができた。

3) ヒト神経芽細胞腫 (NB-1 株) の細胞凝集塊によるコラーゲンゲル内での挙動

2) で大量生産したヒト神経芽細胞腫 (NB-1 株) の細胞凝集塊を、生体内の主要な細胞外マトリックスの一つであるコラーゲン内に包埋し、その挙動を検討した。実験方法として、35mm 培養基材 (ポリスチレン) 内に、作製した細胞凝集塊と三重らせん構造を有する I 型コラーゲン (最終濃度: 2.5mg/mL) をゲル化させ、14 日間、37°C、CO₂ インキュベータ下で培養し、観察した。結果、培養期間が経過するにつれて、コラーゲンゲル内で細胞凝集塊の増殖が観察できた。また、各々の細胞凝集塊の大きさ (ϕ 50-200 μ m) に対して、コラーゲンゲル内での細胞凝集塊の挙動には差は見られなかった。

4) 3D 神経-血管培養評価システムの検証

3D 神経-血管培養評価システムの構築を実現するために、異なる細胞を適切な配置で共培養することで適切な微小環境を設計する。すなわち、2 次元および 3 次元細胞培養のために隣接した別々のチャンネルを準備し、それぞれにおいて異なるタイプの細胞を培養することで、時空間パラメータを制御できる。

培養チップの各々のチャンネルに、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) のモノレイヤー (血管構築物) と、I 型コラーゲンゲル内に包埋したヒト神経芽細胞腫 (NB-1 株) の細胞凝集塊との共培養モデルを作製した。本評価系では、HUVEC 細胞と NB-1 細胞とのパラクライン効果が期待できるため、異なるチャンネル間での細胞の動きを観察した。

結果、ヒト神経芽細胞腫（NB-1 株）の細胞凝集塊がコラーゲンゲル内移動と共に HUVEC モノレイヤーへ浸潤してゆくことが確認できた。異なるチャンネルを組み合わせることで、3D 神経-血管培養評価モデルを作製することができた。今後、本モデルを用いて、さらなるがん細胞凝集塊と HUVEC モノレイヤーとの 2 細胞間の関係性を評価し、そのメカニズムの解明と創薬スクリーニングへの応用に取り組む。

4. 研究内容の倫理面への配慮

ヒト細胞を用いることに対する倫理的配慮：本研究では、ヒト由来細胞および実験動物を用いた研究を行なう。機関の外部委員を含めた倫理審査委員会において生命倫理、安全管理を厳重に審査する。倫理委員会の承認かつ実施施設の長の許可を得て、全ての研究を遂行する。国立成育医療センター研究所においては、ヒト間葉系細胞の培養に関し、研究面において既に倫理審査を受け、承認を受けている（国立成育医療研究センター受付番号 49、平成 15 年 10 月承認、受付番号 55、平成 16 年 11 月追加承認、受付番号 146、平成 17 年 4 月承認、受付番号 156、平成 17 年 7 月承認、受付番号 197、平

成 18 年 6 月承認、受付番号 201、237、238、平成 19 年 6 月承認、受付番号 739、平成 25 年 10 月承認、受付番号 806、平成 26 年 10 月承認）。また、それぞれの組織については倫理的な手続きおよび考え方が年次毎に異なると予想され、「ヒト幹細胞等を用いる臨床研究に関する指針」に従い、最新の社会的な影響を十分に考慮する。なお、研究協力者に倫理専門家を加え、本研究遂行にあたって新たな倫理的問題が生じないように、常にモニタリングを行い、必要に応じて意見交換を行う。

実験動物を用いることに対する倫理的配慮：実験動物を用いる研究については、国立成育医療研究センター動物実験指針に準拠して研究を実施する（承認番号 03-002、04-004、05-003）。特に、動物愛護と動物福祉の観点から実験動物使用は、目的に合致した最小限にとどめる。またその際、麻酔等手段により苦痛を与えない等の倫理的配慮をおこなう。実験者は、管理者と相互協力のもと適切な環境のもと飼育管理を行う。特に、本センター動物実験委員会 委員長 津村秀樹 室長（実験動物管理室）、副委員長 宮戸健二 室長（分担研究者）に確認・計画を立て、動物実験を実施する。