細胞集団浸透性ポリマーの開発

東北大学 大学院工学研究科 材料システム工学専攻^{*1)}, 東北大学 大学院医工学研究科^{*2)}

山本雅哉^{*1,2)}・森本展行^{*1)}

Development of a spheroid-permeable polymer

Spheroids have attracted much attention in medical research as a tool to understand both disease mechanisms and drug actions in culture. Cell-cell and/or cell-extracellular matrices interactions seen in spheroids allow cells to mimic *in vivo* cellular microenvironments, resulting in recapitulating *in vivo*-like cell functions in culture. However, the microenvironments could also function as a barrier to deliver drugs to cells in spheroids. To tackle this drawback, a sulfobetaine polymer was developed as a spheroid-permeable polymer. In this article, the enhanced anticancer activity of anticancer drugs by conjugation with the spheroid-permeable polymer was introduced.

スフェロイドは、疾患メカニズムや薬物作用を培養系で理解するためのツールとして、医学研究で注目されている。スフェロイドにおける細胞と細胞、細胞と細胞外マトリックスの相互作用は、体内の細胞微小環境を模倣することを可能とし、その結果、体内の細胞機能を培養系で再現することができる。しかし、この細胞微小環境は、スフェロイド内の細胞へ薬物を送達する際の障壁としても機能する。この問題を解決するために、スフェロイドに対する細胞集団浸透性ポリマーとしてスルホベタインポリマーを開発した。本稿では、スルホベタインポリマー修飾による抗がん作用の増強について紹介する。

Masaya Yamamoto^{*1,2)}・Nobuyuki Morimoto^{*1)}

Keyword: cell aggregate, spheroid, sulfobetaine polymer, spheroid-permeable polymer

1. はじめに

スフェロイドは、複数の細胞からなる集合体(細胞集団)である。1種類の細胞からなるスフェロイドもあれば、異なる種類の細胞から構成されるスフェロイドもある。スフェロイド内の細胞は、体内と同様に、隣り合う細胞や細胞外マトリックスなどからなる細胞微小環境と相互作用して機能している。このため、スフェロイドは、通常の単層培養された細胞と比較すると、より体内に近い細胞機能が期待される。このようなスフェロイドの特徴から、近年、スフェロイドが再生医療や創薬などへ応用されている。一方、後述するように、スフェロイド内

では物質の透過性が制限されるため、細胞培養での維持も含めて、さまざまな技術が必要不可欠である。ここでは、スフェロイドについて概説するとともに、筆者らの細胞集団浸透性ポリマーに関する研究について紹介する。

2. スフェロイドとは

スフェロイドに関する研究は、さまざまなアプローチからはじまっている。代表的なアプローチとして、肝臓から単離した初代肝細胞を利用したハイブリッド型人工肝臓や薬物研究があげられる。すなわち、初代肝細胞を、集合体化させたスフェロイドとして培養するアプローチである。例えば、肝細胞に含まれる解毒に関与するシトクロム P450(CYP)酵素は、スフェロイドの場合、単層培養よりも高発

^{*1)} Department of Materials Processing, Graduate School of Engineering, Tohoku University

^{*2)} Graduate School of Biomedical Engineering, Tohoku University

現されていることが報告されている¹⁾。

近年、発生生物学、細胞生物学、分子生物学の進歩によって、スフェロイドは、神経幹細胞(neurosphere)²⁾、胚性幹細胞(ES細胞)³⁾、人工多能性幹細胞(iPS細胞)⁴⁾などの幹細胞から目的の細胞を分化誘導する方法として注目されはじめた。例えば、細胞懸濁液を培養容器の蓋にぶら下げるハンギングドロップ法は、液滴内で重力により沈降したES細胞あるいはiPS細胞からなる集合体(embryoid body:EB)を形成させる方法である。さらに、近年、個体の発生過程を模倣した培養法により、EBから臓器機能の一部をもつミニ器官(オルガノイド)を誘導できるようになってきており、より高度な細胞機能をもつスフェロイドとして注目されている。このようなオルガノイドに関する研究の進展とともに、幹細胞からスフェロイドを作製する技術も進歩している。例えば、幹細胞の自己複製能を活用して、フラスコ内で攪拌することにより、スフェロイドを作製することもできるようになっている⁵⁾。また、最近、細胞接着性の低い低接着性培養容器が開発されており、スフェロイドを容易に作製できるようになっている(図1)。これらのスフェロイドをマトリゲルなどの細胞外マトリックス内で培養することによって、より高次の細胞機能を実現することが可能になりつつある。

一方、幹細胞のみならず、がん細胞に対しても、細胞を集合体化して培養する方法が注目されている。がん細胞は、ソフトアガーゲル中において、1つの細胞から増殖した複数の細胞からなるコロニーを形成する能力を有している。このコロニー形成能に基づき、がん細胞も容易にスフェロイドを形成することができる。さらに、集合体化のみならず、がん細胞の細胞機能も幹細胞と同様に変化する。例えば、ヒト肝がん細胞株であるHepG2では、単層培

養と比較して、スフェロイド培養では多剤耐性遺伝子(MDR1)の発現が亢進し、抗がん剤の1つであるドキソルビシン(Dox)の50%阻害濃度(IC₅₀)が8倍以上になることが知られている⁶⁾。すなわち、Doxの抗がん活性が、単層培養と比較してスフェロイドでは低下する。このように、がん細胞は培養条件により細胞機能が変化する。一方、がん治療薬に関する研究では、主に、単層培養されたがん細胞が使用される。したがって、体内の細胞微小環境と著しく異なる場合、期待された抗がん活性が得られない可能性がある。このため体内の細胞微小環境を模倣したスフェロイドを用いたがん治療研究が注目されている。

3. 細胞集団浸透性

スフェロイドを用いた研究における課題の1つがスフェロイドの培養技術である。スフェロイドを培養すると、細胞間の密着結合や細胞と細胞との間に細胞外マトリックスが沈着する場合がある。これらは体内の細胞微小環境を模倣するために必要不可欠である。一方、スフェロイドが大きくなれば、必要となる栄養や酸素の供給ならびに老廃物の排出が阻害される。例えば、膵臓においてインスリンを産生する膵β細胞からなる細胞集団(ランゲルハンス島)では、細胞あたりの栄養や酸素の消費量、栄養や酸素のランゲルハンス島内の拡散などを考慮すると、ランゲルハンス島表面から約200μm程度までしか細胞が生存できないことが見積もられている⁷⁾。すなわち、スフェロイドを再生医療などに利用する場合には、内部の細胞にまで栄養や酸素を供給するためのバイオリアクターが必要不可欠である(図2)。

がん治療研究では、細胞死が主な抗がん活性の指標となるため、がん細胞スフェロイドにおける細胞

図1 スフェロイド作製法の例

図2 バイオリアクターの例

死の原因が、抗がん活性であるのか、あるいは単なる栄養や酸素の供給不足であるのか、これらを区別する難しさがある。また、細胞に到達する薬物量も単層培養された細胞と比較して低くなることが予想され、薬物の抗がん活性に加えて、薬物の細胞集団浸透性も考慮する必要がある。

細胞集団に薬物を浸透させるルートとして、細胞を通り抜けさせる場合と細胞間を通り抜けさせる場合のいずれか、あるいはこれら両方の3つが考えられる。細胞を通り抜けさせる場合、細胞内へのドラッグデリバリーシステム(DDS)を考える必要がある。ここで、リポソーム製剤や高分子ミセルなどのナノキャリアが細胞内に取り込まれる経路は、主に、①細胞膜直接透過、②エンドサイトーシス、および③膜融合である。一方、細胞間を通り抜けさせる場合、細胞間の密着結合や細胞間への細胞外マトリックスの沈着を考慮する必要がある。難治性のがんにおいて、細胞外マトリックスの沈着がナノキャリアの浸透性を著しく阻害することを示唆する知見も示されつつあるが⁸⁾、細胞外マトリックスがナノキャリアの浸透性に与える影響の解明には、今後の研究が待たれる。このような状況の中、がん組織浸透性をもつ高分子薬剤として、ホスホベタインポリマーの1つである MPC(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine) と BMA(butyl methacrylate) との共重合体(poly(MPC-co-BMA)) が Ishihara らによって報告された⁹⁾。MPC ポリマーは、細胞膜中に存在しているホスホリルコリン基をもつベタインポリマーであり、さまざまな医療機器で生体適合性を示す¹⁰⁾。poly(MPC-co-BMA) が、がん組織浸透

性を示すメカニズムは詳細に解明されていないが、細胞膜透過性などを有している¹¹⁾。これまでに、筆者らは、スルホ基を有するスルホベタインポリマーが、同様に細胞膜透過性を有することを報告してきた^{11~13)}。

4. ベタインポリマー

ベタイン(betaine)とは、正電荷と負電荷を同一分子内の隣り合わない位置にもち、分子全体としては電荷電位をもたない分子内塩である。このような分子内塩を有するモノマーからなる高分子をベタインポリマーと呼ぶ。一般に、アニオンやカチオンなどの電荷をもつ高分子電解質は、水中で水の構造を強く形成／破壊するが、ベタインポリマーは、その効果が比較的穏やかである。さらに、ベタインポリマーは、それぞれのイオン性基の種類と数によって分類される。例えば、リン酸基を有するホスホベタイン(例えば MPC ポリマー(PMPC))、カルボキシ基を有するカルボベタイン(例えば poly[(2-dimethacryloyloxyethyl) ammonium methyl carbanate](PDMAMC))、スルホ基を有するスルホベタイン(例えば poly-[3-dimethyl(methacryloyloxyethyl) ammonium propane sulfonate](PDMAPS))があげられる¹⁴⁾。

ベタインポリマーは、側鎖間で双極子-双極子相互作用により分子内や分子間で会合し、さらに疎水基を導入することにより、自己組織的にベシクルなどを形成する(図3)^{14,15)}。さらに、ベタインポリマーのアンチファウリング性により、非標的タンパク質

PDMAPS
Poly (3-dimethyl (methacryloyloxyethyl) ammonium propane sulfonate)

図3 ベタインポリマーの双極子-双極子相互作用による会合

や細胞の吸着を防ぐ効果が期待できる。そのため、医療デバイスへの応用や DDS 材料として研究が進められている¹⁵⁾。例えば、poly[2-(methacryloyloxy)ethyl phosphorylcholine]-*block*-poly[2-(diisopropylamino)ethyl methacrylate] は、pH 応答性を示し、Dox やパクリタキセルを内包した状態で扁平上皮がん細胞内に特異的に内在化されること¹⁶⁾、poly(lactide-*co*-glycolide)-*block*-poly(carboxybetaine) は、カルボベタインのもつカルボキシ基を利用することによって、蛍光分子や標的リガンドで修飾された診断ナノキャリアを容易に調製できること¹⁷⁾、poly(ϵ -caprolactone)-*block*-poly(*N,N*-diethylaminoethyl methacrylate)-*ran*-(*N*-(3-sulfopropyl)-*N*-methacryloyloxyethyl-*N,N*-diethylammoniumbetaine)) が細胞内に内在化し、アポトーシスを誘発できることなどがあげられる¹⁸⁾。

ベタインポリマーの1つであるスルホベタインポリマーは、双極子-双極子相互作用が強く、高い粒子形成能をもつことに加え、PMPC と同様に、生体適合性や非タンパク質吸着能に優れていることが報告されている^{19~22)}。さらに、カチオン性ブロックや pH 応答性ブロックなどの共重合体が合成され、機能性キャリアとして DDS へ応用されている^{23, 24)}。

5. スルホベタインポリマー

筆者らは、これまで、スルホベタインポリマーとして、PDMAPS に着目してきた。PDMAPS

は、合成が容易であり、低細胞毒性、上限臨界共溶温度(UCST)型の温度応答性、イオン性ポリマーとの複合体形成などの特性を有する。しかし、PDMAPS には、双極子-双極子相互作用により水中で凝集するという問題がある。そこで、筆者らは、PDMAPS と同様に生体適合性をもち、親水性が高いノニオン性の poly(ethylene glycol) (PEG) との共重合体を合成した。

PEG 鎖が修飾された連鎖移動剤を用いて得られたブロック共重合である PEG-*block*-PDMAPS は、純水中で自己組織的に1 μ m 程度の多層型マイクロスフェアを形成し、UCST 型の温度応答性を示した。また、この UCST は塩濃度によって制御可能であった²⁵⁾。さらに電場の印加、およびずり応力の付加によりマイクロスフェア間の融合-解離など、多重の刺激応答制御を可能とした(図4)²⁶⁾。また、UCST 型の温度応答性を利用することによって、オリゴ DNA の内包と、内包されたオリゴ DNA をマイクロスフェア間で交換できることも確認している²⁷⁾。

PEG methyl ether methacrylate (PEGMA) とのランダム共重合体 P(DMAPS-*ran*-PEGMA) (P(SB-PEG)) は、生理条件下(37℃、リン酸緩衝生理食塩水(PBS))において自己組織的にナノサイズの粒子を形成した。ヒト子宮頸がん細胞(HeLa 細胞)に対し、P(SB-PEG) を作用させたところ、P(SB-PEG) は細胞毒性を示さず、核やミトコンドリアを含む細胞全体に分布することを見出した。また、P(SB-PEG) はエンドサイトーシスが阻害される低温条件(4℃)でも取り込まれ、逆に、エンドサイトー

図4 ベタインポリマーの双極子-双極子相互作用による会合

図5 P(SB-PEG)のHeLa細胞内分布とエンドサイトーシス阻害剤による取り込み量変化

シスの各種経路の阻害剤添加条件において、取り込み量の減少が認められないことから、エンドサイトーシス非依存的に細胞内に取り込まれていることも明らかにした(図5)²⁸⁾。

6. スルホベタインポリマーの細胞集団浸透性

脳腫瘍の1つである膠芽腫(glioblastoma)は、悪性神経膠腫の82%を占めている。A-172細胞は、脳の神経細胞を支える神経膠細胞(星状細胞、未分化グ

リア)が腫瘍化した細胞から樹立された細胞株である²⁹⁾。このA-172細胞を、低細胞接着性のU-bottom 96-well plate(Prime Surface, Sumitomo Bakelite Co. Ltd., Tokyo, Japan)に1500細胞/wellの濃度で播種後、4日間培養することにより、直径約300μmの丸い形状をしたスフェロイドが得られる。得られたA-172スフェロイドは、E-cadherinを全体に発現しており、その内部は低酸素状態であった。

赤色蛍光を示す抗がん剤Doxにより修飾されたP(SB-PEG)、Dox-P(SB-PEG)を用いて、A-172

スフェロイドにおける P(SB-PEG) の細胞集団浸透性を評価した。共焦点レーザー走査顕微鏡を用いて、培養液を 20℃ に維持しながらスフェロイドの赤道付近をタイムラプス観察したところ、Dox-P(SB-PEG) は、添加直後にスフェロイド表面で確認され、その後、徐々にスフェロイド内部へ浸透した。蛍光強度のラインプロファイルから、Dox-P(SB-PEG) は、添加 60 分以内にスフェロイドの中心に到達したことがわかった(図 6)。一方、コントロールとして用いた P(SB-PEG) 修飾していない Dox (Free Dox) では、スフェロイド表面付近に Dox の弱い蛍光を認めた。この蛍光は、添加 30 分後に初めて確認された。また、いずれのコントロールの場合でも、添加 120 分後であっても、スフェロイド表面から 1～2 層の細胞までしか到達していないことがわかった。以上の結果は、P(SB-PEG) が細胞集団浸透性をもつことを示唆している。

7. 細胞集団浸透性スルホベタインポリマーで修飾した抗がん剤のがん細胞スフェロイドに対する抗がん活性

P(SB-PEG) の細胞集団浸透性を活用して、スフェロイド内部への抗がん剤のデリバリーについて検討した。抗がん剤として、DNA 合成を阻害する Dox と熱ショックタンパク質の 1 つである HSP90 を阻害するタネスピマイシン (17AAG)³⁰⁾ とを用いた。A-172 スフェロイドの体積は、抗がん剤非存在下で培養 10 日後には約 2.3 倍に増加するが、Dox-P(SB-PEG) 処理したスフェロイドの体積は、Dox-P(SB-PEG) 添加濃度 10 μ M 以上で低下し、増殖阻害が認められた。しかし、Free Dox でも同等の増殖阻害が認められた(図 7)。Free Dox と同等の増殖阻害となった原因として、Dox-P(SB-PEG) はスフェロイド内の細胞に認められたが、そのスフェロイド内の局所濃度が IC₅₀ 濃度よりも低くなった可能性や、スフェロイド外層の細胞に Free Dox が

図6 A-172スフェロイドへの P(SB-PEG) の細胞集団浸透性

図7 Dox-P(SB-PEG)によるA-172スフェロイドの増殖阻害

図8 17AAG-P(SB-PEG)によるA-172スフェロイドの増殖阻害

作用した可能性などが示唆された。また、Dox-P(SB-PEG)が細胞内のミトコンドリアに集積することから、細胞内分布が影響した可能性も考えられる。

一方、P(SB-PEG)修飾した17AAG(17AAG-P(SB-PEG))のA-172スフェロイドに対する増殖阻害について評価したところ、17AAG-P(SB-PEG)は、P(SB-PEG)修飾していない17AAG(Free 17AAG)と比較して有意な増殖阻害を示した。Free 17AAGは $3\mu\text{M}$ 以上でA-172スフェロイドの増殖を顕著に阻害した。また、P(SB-PEG)修飾により17AAGの効果は約10倍になった(図8)。さらに、Live/Deadアッセイを行ったところ、17AAG-P(SB-PEG)を添加した場合、スフェロイド全体に死細胞に由来する赤色蛍光が認められた(データ省略)。この結果は、17AAG-P(SB-PEG)がA-172スフェロイド内部へ浸透し、細胞死を誘導したことを示唆している。

図9 17AAG-P(SB-PEG)によるA-172スフェロイドの3Dマトリックスへの浸潤阻害

Matrigelに封入したA-172スフェロイドを用いて、3Dマトリックスへの浸潤アッセイを行った。その結果、17AAG-P(SB-PEG)の非存在下では、1日目に明らかな浸潤が観察され、3日目の浸潤面積は0日目の面積に比べて15.8倍に増加した。一方、17AAG-P(SB-PEG)の添加により、この浸潤はFree 17AAGと比較して有意に抑制された(図9)。

以上のことから、P(SB-PEG)の細胞集団浸透性は、スフェロイドに対する抗がん剤の作用機序を含めた研究への応用が可能であることが示唆された³⁰⁾。

8. おわりに

本稿では、がん細胞スフェロイドに対するスルホベタインポリマーの細胞集団浸透性について概説した。一方、がん細胞のみならず、iPS細胞などの幹細胞から誘導されたスフェロイドがオルガノイドとして創薬へ応用されている。さらに、疾患特異的iPS細胞を利用すれば、より病態に近いモデルを用いた創薬も可能になりつつある。細胞集団に特有の薬物の低い浸透性は、これらの創薬におけるデメリットであり、今後、ますます、細胞集団浸透性DDS技術の開発が期待される。

文献

- 1) Wu F.J., *et al.*, *Cell Transplant.*, **8**, 233–246 (1999)
- 2) Doetsch F., *et al.*, *Cell*, **97**, 703–716 (1999)
- 3) Thomson J.A., *et al.*, *Science*, **282**, 1145–1147 (1998)
- 4) Takahashi, K., *et al.*, *Cell*, **131**, 861–872 (2007)
- 5) Otsuji T.G., *et al.*, *Stem Cell Reports*, **2**, 734–745 (2014)
- 6) Oshikata A., *et al.*, *J. Biosci. Bioeng.*, **111**, 590–593 (2011)
- 7) 岩田博夫, 生体組織工学, 産業図書, 215–217 (1995)
- 8) Tanaka H.Y., *et al.*, *Cancer Sci.*, **109**, 2085–2092 (2018)
- 9) Kamei T., *et al.*, *Cancer Sci.*, **102**, 200–205 (2011)
- 10) Ishihara K., *et al.*, *J. Biomed. Mater. Res. A*, **107**, 933–943 (2019)
- 11) Goda T., *et al.*, *Langmuir*, **36**, 9977–9984 (2020)
- 12) Morimoto N., *et al.*, *Sci. Rep.*, **8**, 1128 (2018)
- 13) Morimoto N., *et al.*, *Macromol. Biosci.*, **20**, e2000205 (2020)
- 14) Erfani A., *et al.*, *Biomacromolecules*, **21**, 2557–2573 (2020)
- 15) Kobayashi M., *et al.*, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, **25**, 1673–1686 (2014)
- 16) Helen C.E., *et al.*, *Mol. Pharm.*, **11**, 1176–1188 (2014)
- 17) Zhiqiang C., *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **49**, 3771–3776 (2010)
- 18) Jun C., *et al.*, *Biomaterials*, **35**, 4517–4524 (2014)
- 19) West L.S., *et al.*, *Biomaterials*, **25**, 1195–1204 (2004)
- 20) Yang J., *et al.*, *Langmuir*, **31**, 9125–9133 (2015)
- 21) Ren P.F., *et al.*, *Langmuir*, **31**, 5851–5858 (2015)
- 22) Zhang Z., *et al.*, *Langmuir*, **22**, 10072–10077 (2006)
- 23) Dai F., *et al.*, *Biomaterials*, **32**, 628–638 (2011)
- 24) Chen C.Y., *et al.*, *Macromol. Rapid Commun.*, **35**, 1534–1540 (2014)
- 25) Morimoto N., *et al.*, *Macromol. Rapid Commun.*, **35**, 103–108 (2014)
- 26) Morimoto N., *et al.*, *RSC. Adv.*, **5**, 14851–14857 (2015)
- 27) Morimoto N., *et al.*, *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, **128**, 94–99 (2015)
- 28) Morimoto N., *et al.*, *Biomacromolecules*, **17**, 1523–1535 (2016)
- 29) Sanchez–Martin C., *et al.*, *Front. Oncol.*, **10**, 1177 (2020)
- 30) Morimoto N., *et al.*, *Biomacromolecules*, **21**, 5044–5052 (2020)