Physios Biotech

Technical Note

発表論文: Y. Nashimoto *et al.*, ***Biomaterials***, 229, 119547, 2020.

灌流可能な血管網を備えた腫瘍スフェロイドモデルによる薬剤応答評価

従来の細胞培養系や動物モデルは、生理学的妥当性や三次元的な微小環境に乏しく、がん治療薬のスクリーニングにおいて約43%が開発後期で失敗する要因となっている。複数の細胞種から構成される異種細胞スフェロイドは、腫瘍微小環境（TME）をより忠実に再現できるが、*in vivo*のような生体力学的刺激を与えるためには、長時間の灌流によって流体ストレスを再現する必要がある。本研究では、灌流可能な血管網と統合した腫瘍スフェロイドモデルを構築し、*in vivo*に近いTMEの再現を試みた。このシステムは24時間以上の灌流に対応しており、腫瘍細胞の増殖を促進し、細胞死を抑制する効果が認められた。静置条件下で行った薬剤試験では、血管なしの条件では見られなかったパクリタキセルに対する用量依存的な応答が認められ、経血管的な薬剤投与の有用性を示せた。本三次元モデルは、従来の2次元培養や動物モデルに代わる、生理学的妥当性の高い創薬スクリーニングプラットフォームとして有望である。

実験概要

MPSチップはPDMS製であり、スフェロイドを配置する中央流路と、その左右に血管内皮細胞を導入する流路の計3流路から構成されている（図1a）。肺線維芽細胞、乳がん細胞（MCF-7）、臍帯静脈由来血管内皮細胞（HUVEC）を1:3:1の比率で懸濁し、低接着性のU底ウェルに播種して2日間培養することでスフェロイドを形成した。形成されたスフェロイドをフィブリンゲル溶液と混合し、中央の流路に導入後、37°Cで15分間インキュベートしてゲル化させた。左右の流路には培地を導入し、翌日、HUVECをそれぞれの流路に導入してゲル界面への接着を促した。この時点をDay 0と定義した。

Day 7からは灌流培養を開始し、血管の有無がスフェロイドに及ぼす影響を評価した。灌流にはシリンジポンプを用い、左側流路のリザーバーから30 µL/hの速度で培地を連続的に供給した。Day 11に培養を終了し、パラフィン切片を作製して、増殖マーカー Ki67およびアポトーシスマーカー ssDNAによる染色を行った。

さらに、Day 7以降に静置下でパクリタキセルを投与し、血管の有無による薬剤の効果の違いを評価した。

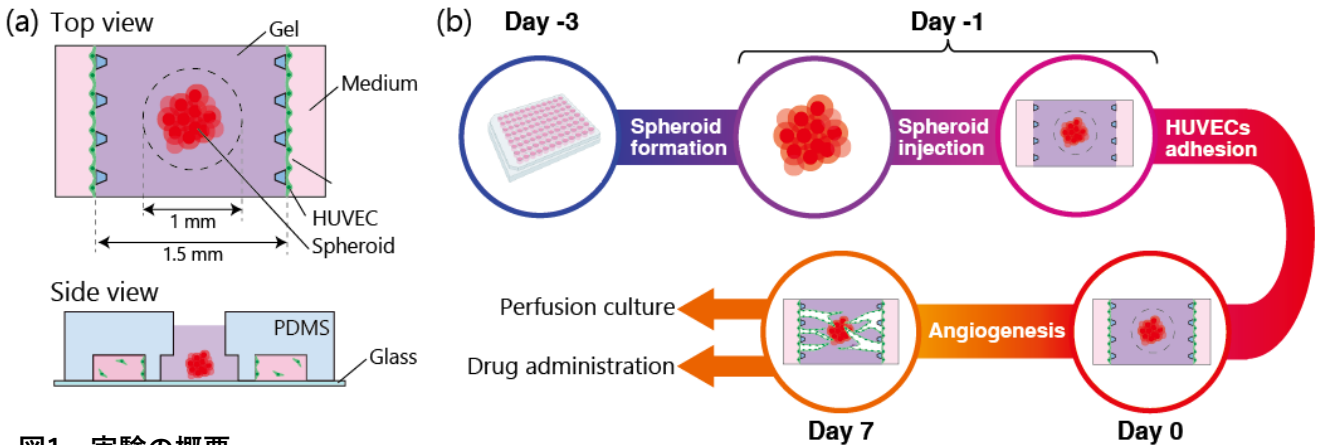

図1　実験の概要

a. 使用したMPSチップの概要。　b. 実験手順。

血管の有無によるスフェロイドの評価

共焦点顕微鏡での観察により、Day 7でスフェロイドが左右の流路から伸長した血管と結合している様子を確認した。Day 7から4日間、灌流培養を実施しH&E染色で評価したところ、血管を形成した条件では、Ki67陽性の面積が増加し、ss-DNA陽性の面積が減少していた。このことから、灌流可能な血管構造が腫瘍細胞の増殖および生存を促進していた。

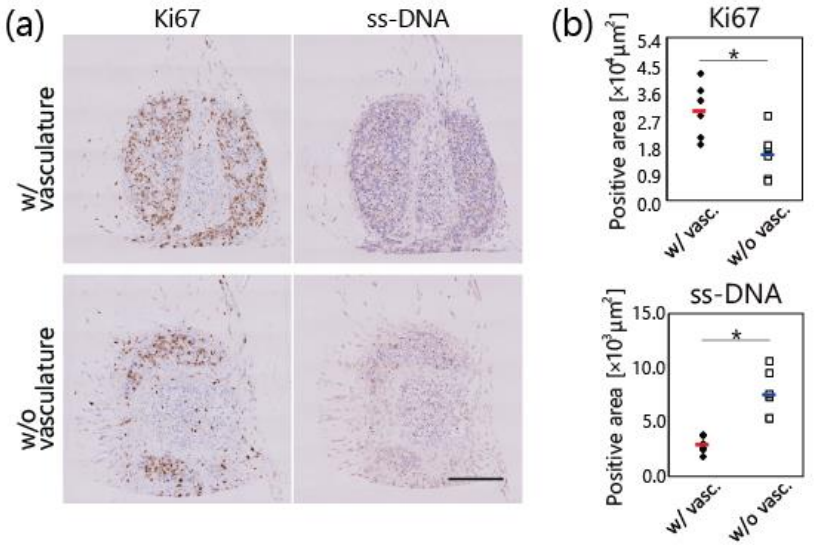

図2　血管の有無の比較

a. H&E染色画像。Scale bar: 200 μm

b. Ki67、ss-DNAの定量評価。*p < 0.05 (t-test)

パクリタキセル投与による体積減少

静置条件で経血管的にパクリタキセルを投与した場合、5 ng/mL、50 ng/mLの投与量では、血管周囲に存在するMCF-7のE-cadherinの発現量が減っていた（図3a, 白矢印）。500 ng/mLの投与量では、血管が損傷し、ネットワーク構造が壊れた（図3a）。スフェロイドのH&E染色像から体積を推定したところ、血管なしの条件では、パクリタキセルの投与量を増やしても体積の変化は見られなかった。一方、血管ありの条件では、パクリタキセルの投与量依存的に体積が減少した（図3b）。以上より、経血管的にパクリタキセルを投与することにより、抗がん作用を評価できることを示せた。

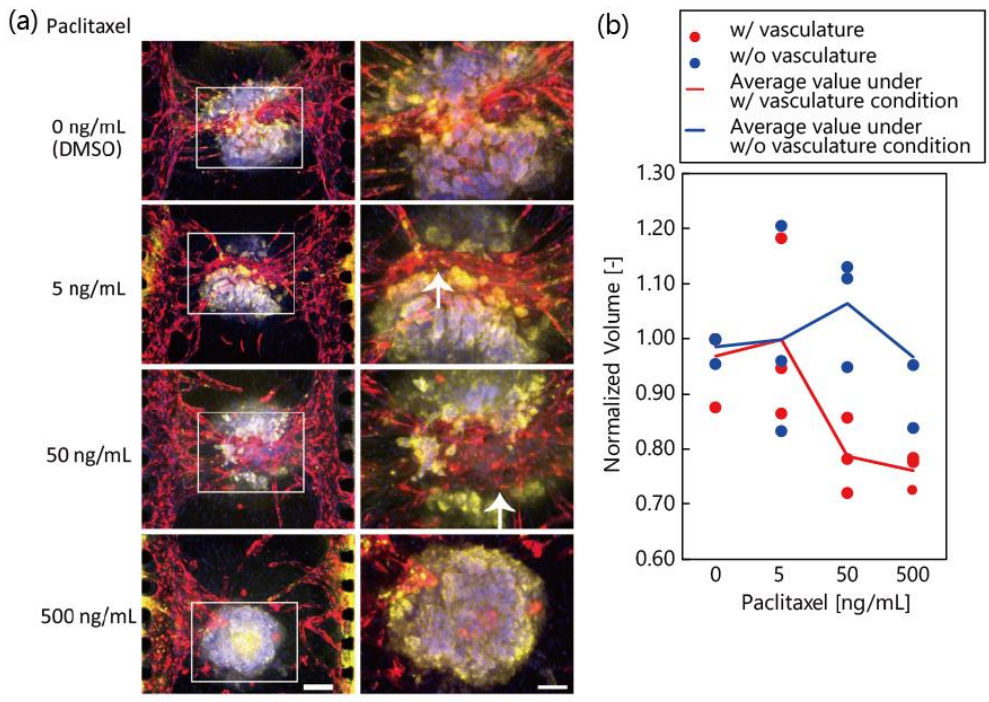

図3　血管の有無によるパクリタキセルの効果の違い

a. 各濃度のパクリタキセルを投与した後の免疫染色画像。白矢印はE-cadherinの発現が弱い箇所を示す。Red: RFP-HUVECs, yellow: E-cadherin (MCF-7), blue: nuclei. Scale bars: 200 μm (left column), 100 μm (right column).

b. H&E染色画像から推定したスフェロイドの体積。各条件、0 ng/mLでのスフェロイド体積で正規化した。