

3D バイオプリンターを用いた脳腫瘍モデルの萌芽研究と ナノメディシン創薬への応用

名古屋市立大学 大学院薬学研究科
薬物送達学分野・准教授 田上 辰秋

名古屋市立大学 大学院薬学研究科
薬物送達学分野・教授 尾関 哲也

1. 研究の背景・目的

Glioblastoma は治療を行ってもほぼ必ず再発・悪化する予後の悪い悪性脳腫瘍として広く知られている。これまでに様々な治療法が検討されており外科的手術に加えて化学療法や放射線治療が行われている一方で、最近の新しい治療法として、個々の患者に合わせた治療法が考案されている。例えば、分子標的薬や遺伝子治療、さらには外科手術で摘出した腫瘍組織を用いた、自家腫瘍ワクチン（がん免疫ワクチン）のようなオーダーメイド医療が検討されている。

筆者は、様々な機能を持たせたナノメディシン（ナノ医薬品）の創薬研究に多く携わっており、特にがんに対する様々なナノメディシンのものづくりの研究を行ってきた[1]。様々な素材（リポソーム（リン脂質）、ポリマー）のナノ粒子の中から、これまでに認可されているナノ医薬品にはない機能を持った金ナノ粒子を新しい医薬品のモデルとして発案するに至っている。

上記の背景より、個々の患者に有効なナノメディシンを簡便にスクリーニングできる、患者の悪性脳腫瘍からできたミニ脳腫瘍のモデルが簡便につくれたら、患者に対する治療の善後策に役立てることができるのではないかと考えるに至った。本研究では、3D バイオプリンターを用いた脳腫瘍 3D モデルの作製とレーザー刺激応答性ナノメディシンのモデルとして多孔性金ナノ粒子の作製について基礎的研究を行った。

2. 研究の対象ならびに方法

3D プリンターインクの調製および 3D プリンティング：

ゼラチンとメタクリル酸を結合したポリマー (GelMA) の合成を行った[2]。豚ゼラチンをバッファー (pH9.0) に溶解した後、無水メタクリル酸を加えて1時間攪拌し、50°Cで2日間透析を行った。その後さらに2日間凍結乾燥させることにより GelMA を得た。GelMA を水に再溶解後、光重合開始剤と増粘剤 (HPMC) を加えてインクを作製した。脳腫瘍細胞株であるラット C6 グリオーマの懸濁液を混合し、3D バイオプリンターで造形し、光照射・光架橋することで最終的にミニ脳腫瘍を得た。

多孔性金ナノ粒子の調製：

塩化金酸溶液に硝酸銀と還元剤を添加・攪拌し、金と銀からなる複合ナノ粒子の作製を行った。その後洗浄操作で銀を除去することにより、多孔性金ナノ粒子を得た。多孔性ナノ粒子に抗がん剤であるドキソルビシン溶液を混合し孔内に吸着させた。金ナノ粒子を透過型電子顕微鏡及び動的光散乱法で評価した。また研究室が保有する近赤外レーザーをマイクロチューブにいれたサンプルに照射し、近赤外線サーモグラフィーで温度変化をモニターすることにより、光温熱効果の評価を行った。また、脳腫瘍モデルに含まれるラット C6 グリオーマ細胞株の細胞生存率・細胞増殖率を検討するために WST アッセイキットを用いて評価を行った。

3. 研究結果

① 3D バイオプリンターを用いた脳腫瘍 3D モデルの作製

ゼラチンをベースにした生体親和性の高い GelMA の合成率を 2, 4, 6-trinitrobenzenesulfonic acid sodium salt dihydrate を用いた比色定量により評価したところ、GelMA の合成に成功し高い合成率を示した (80%以上)。またプリンターインクの調製検討として、ヒドロキシプロピルメチルセルロース (HPMC) を含有させることにより、3D プリンティングに適した粘度域のインクを得ることができ、我々の以前の研究報告を裏づける結果が得られた。さらに、GelMA 濃度を調節することで造形した後も十分に形状を維持し、かつ光架橋も十分にできることを確認した。

② レーザー刺激応答性ナノメディシンの作製法の確立と 3D モデルを用いた治療効果

還元剤や攪拌速度などの実験条件を検討し、形成される粒子の大きさや吸収波長のスペクトラムを測定した。その結果、吸収波長のピークが異なる多孔性金ナノ粒子を得ること

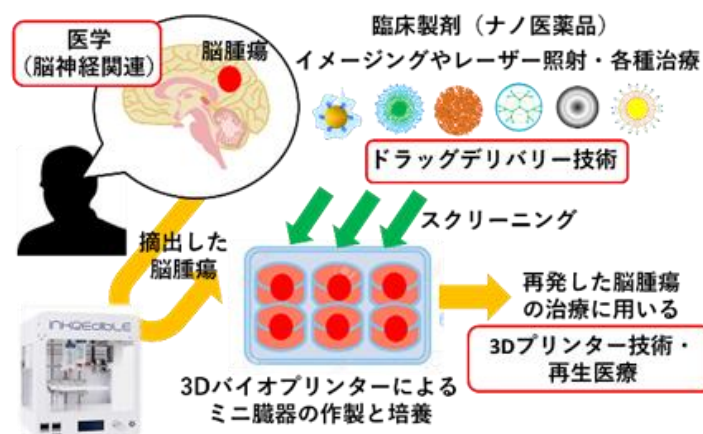
ができ、最終的に近赤外レーザーの波長領域（660 nm）を効率的に吸収することのできる粒子を得ることができた。透過型電子顕微鏡により観察を行った結果、作製した金ナノ粒子は非常に小さなナノ粒子が集まった多孔性のナノ粒子であった。次にレーザー照射を行い、レーザー照射における経時的な温度変化を調べたところ、顕著な温度上昇を確認しており、がんの光温熱療法のキャリアとして有用であることが示唆された。

4. 考察

近年、3D バイオプリンターを用いた臓器モデルの開発が活発に行われており、「mini-brain」の調製が報告されている[3-5]。

本研究では、脳腫瘍モデルの作製を 3D バイオプリンターを用いて行った。3D バイオプリンターを用いることで、脳腫瘍細胞だけでなく、最終的に脳腫瘍の形成を支持する細胞（腫瘍随伴マクロファージ）を 3 次元配置することで脳腫瘍を部分的に模した構造のモデルが短時間で作製できることが期待できる。

本研究の検討の結果、GelMA を含むプリンターインクは、細胞の足場形成に効果的でミニ脳腫瘍の作製に適していることが示唆された。今後は、細胞や各種添加因子を含むバイオインクを用いて細胞生存率やがんの進展をより模倣した 3D モデルの作製を行いたいと考えている。GelMA と増粘剤を主成分とするプリンターインク（ハイドロゲル）を採用することにより 3D バイオプリンティングにおいて有用な情報を得ることができた。



将来的には上記のような評価システムの構築を行うことを想定している。脳腫瘍患者から脳腫瘍を摘出する。その後、脳腫瘍組織を用いプリンターインクを用いて造形し、脳腫

瘍モデルを作製する。次に作製したナノメディシンを用いてスクリーニングを行うことにより、効果の高いものを探索し、患者に投与する。このような患者に合わせたがんの個別化医療は最大の治療効果を得るという意味で有用な治療様式になるのではないかと考えられる。

今後は、プリンターインクの改良とともに、多孔性金ナノ粒子をミニ脳腫瘍に投与しレーザー照射することによる抗腫瘍効果の測定を行っていきたいと考えている。

最後になりましたが、本研究を遂行するにあたり、助成いただきました公益財団法人愛知県がん研究振興会に深く感謝申し上げます。

5. 文献

[1] Tatsuaki Tagami, Tetsuya Ozeki. Recent Trends in Clinical Trials Related to Carrier-Based Drugs. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 106 (9): 2219-2226 (2017).

[2] Jin Liu, Tatsuaki Tagami, Tetsuya Ozeki. Fabrication of 3D-Printed Fish-Gelatin-Based Polymer Hydrogel Patches for Local Delivery of PEGylated Liposomal Doxorubicin. *Marine Drugs*, 18(6): 325 (2020)

[3] Hsih-Yin Tan, Hansang Cho, Luke P. Lee. Human Mini-Brain Models. *Nature Biomedical Engineering* 5: 11–25 (2021)

[4] Hao-Wei Han, Shan-hui Hsu. Using 3D Bioprinting to Produce Mini-Brain. *Neural Regeneration Research*. 12(10): 1595–1596 (2017)

[5] Marcel Alexander Heinrich, Ruchi Bansal, Twan Lammers, Yu Shrike Zhang, Raymond Michel Schiffelers, Jai Prakash. 3D-Bioprinted Mini-Brain: a Glioblastoma Model to Study Cellular Interactions and Therapeutics. *Advanced Materials*, 31(14): 1806590 (2019)

6. 論文発表

現在、論文投稿に向け、追加実験を行っています。