

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K12521

研究課題名(和文) がんの不均一性を有するグリオーマ幹細胞浸潤プロセスのマイクロバイオメカニクス

研究課題名(英文) Microbiomechanics of glioma stem cells representing tumor heterogeneity in their invasion process

研究代表者

須藤 亮 (SUDO, RYO)

慶應義塾大学・理工学部(矢上)・准教授

研究者番号：20407141

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、マイクロ流体デバイスを用いてグリオーマ幹細胞と血管内皮細胞の共培養を行い、グリオーマ幹細胞が3次元的に浸潤するプロセスの解明に取り組んだ。特に、微小培養環境因子として、グリオーマ幹細胞の分化状態、間質流、血管との相互作用、に着目し、グリオーマ幹細胞の浸潤を支配する因子を検討した。その結果、以下のことが明らかになった。グリオーマ幹細胞は幹細胞条件よりも分化条件において間質流へ顕著な反応を示した。グリオーマ幹細胞に間質流を負荷すると、間質流の下流方向へ多数の浸潤突起を伸ばし、浸潤距離も増加した。グリオーマ幹細胞は、血管内皮細胞と共培養することで浸潤能力を獲得した。

研究成果の概要(英文)：This project aimed to investigate 3D invasion process of glioma stem cells (GSCs) coculturing with endothelial cells (ECs) using a microfluidic device. In particular, we focused on microenvironmental factors such as differentiation status of GSCs, interstitial flow, and interactions with blood vessels, to investigate control factors of GSC invasion. Our results revealed following things. 1) GSCs in differentiation conditions significantly responded to interstitial flow application compared with those in stem cell conditions. 2) GSCs extended characteristic protrusions downstream of interstitial flow, resulting in an increased invasion distance. 3) GSCs acquired invasion activity in the presence of ECs.

研究分野：細胞バイオメカニクス

キーワード：3次元浸潤モデル 間質流 共培養 グリオーマ幹細胞

1. 研究開始当初の背景

がんによる死亡者数は著しい増加傾向にあり、日本では2013年度に約36万人が亡くなっている。全死亡者に占める割合は30.1%で、死因順位の1位である。がんの中でもグリオーマ(脳腫瘍の一種)は極めて悪性度の高いがんであり、治療技術の進歩した現在でも生存期間は極めて短い。グリオーマは脳内に広く浸潤し、病状が進行した状態で発見されることが多いため、発生起源や腫瘍形成のプロセスが明らかになっていない。そのため、グリオーマの治療戦略を考えるために、腫瘍形成メカニズムや浸潤プロセスを理解することが重要な課題になっている。

研究代表者は、これまでの研究でマイクロ流体デバイスを用いて微小培養環境を制御した三次元培養法を開発してきた。その中で、肝細胞と血管内皮細胞の共培養モデルを構築し、間質流が形態形成を制御するうえで重要な役割を持つことを示した。この培養デバイスは様々な種類の細胞に用いることができ、このマイクロ流体デバイスを用いた三次元培養法はNature Protocols誌の表紙にも掲載され、工学的手法を用いた新しい培養法として期待されている。

研究代表者は組織工学研究に取り組む一方で、がん細胞を用いた新たな研究を始めている。特に、マイクロ流体デバイスの培養技術を肝がん細胞に応用し、間質流による力学的刺激が肝がん細胞の増殖や遊走に顕著な影響を与えることを見出した(Kalchman et al., Microfluid Nanofluid, 2013)。この成果は、がん細胞と力学的刺激の関係を示す重要な知見であるが、実験に用いた細胞は肝がん由来の細胞株であり、性質が均一な細胞集団である。しかし、実際のがん組織は、様々な性質を有するがん細胞から構成される極めて不均一な細胞集団であることが知られており、このような培養モデルは実現されていない。そこで、細胞株を用いた研究から不均一性を有する「がん幹細胞」を用いた研究に発展させる必要性を認識するに至った。

2. 研究の目的

本研究では、マイクロ流体デバイスを用いてグリオーマ幹細胞と血管内皮細胞の共培養を行い、微小培養環境を制御することで、バイオメカニクスの観点からグリオーマ幹細胞の三次元浸潤プロセスを解明する。特に、微小培養環境因子として、①グリオーマ幹細胞の分化状態、②力学的な環境因子(間質流)、③血管との相互作用(血管内皮細胞との共培養)、の3点に着目し、グリオーマ幹細胞の浸潤を支配する環境因子を明らかにすることを目的とした。その際、三次元の間質に浸潤する細胞を可視化するためにマイクロ流体デバイスを利用することで、グリオーマ幹細胞の浸潤プロセスや遊走の形態を詳細に解析することによって、グリオーマ幹細胞と環境因子の相互作用を定量的に解析するこ

とに主眼をおいた。

3. 研究の方法

本研究では、以下の4つのステップによって段階的に研究を進め、最終的にグリオーマ幹細胞が有する「がんの不均一性」と、がん細胞の浸潤の関係をバイオメカニクスの観点から明らかにした。その際、マイクロ流体デバイスを用いることによって細胞配置や間質流などの微小培養環境を制御し、グリオーマ幹細胞の浸潤プロセスをモニタリングし、バイオメカニクスの観点から定量的に評価した。

(1)ステップ① マイクロ流体デバイスの作製とグリオーマ幹細胞の三次元浸潤モデル構築

マイクロ流体デバイスは、微細加工を施したシリコンウエハを鋳型としてマイクロ流路パターンを転写したシリコンゴム(PDMS)とカバーガラスをプラズマ接着することによって作製した。マイクロ流体デバイスには平行な2つのマイクロ流路があり、その間にコラーゲンを配置したデザインとし、マイクロ流路から播種したグリオーマ幹細胞は流路表面に露出したゲル表面に接着させた。

(2)ステップ② グリオーマ幹細胞の分化・未分化状態と浸潤形態の定量的評価

グリオーマ幹細胞はがん幹細胞の一種であり、培養液へ添加する因子を調整することによって分化・未分化状態を調節することができる。ステップ①において構築した三次元浸潤モデルを用いて、グリオーマ幹細胞が未分化状態を維持した浸潤モデルと分化させた場合の浸潤モデルを作成し、分化・未分化の状態が三次元浸潤形態にどのような影響を及ぼすのか定量的に評価した。評価基準としてグリオーマ幹細胞の最大浸潤距離や細胞数、細胞間接着、細胞突起の形態などに着目し、位相差顕微鏡画像を用いて定量化した。また、グリオーマ幹細胞の分化・未分化状態を調節し、それぞれ単独で培養する実験をさらに発展させ、分化・未分化細胞を混合した細胞集団を作成し、浸潤プロセスにおける分化・未分化細胞の役割を明らかにする。この時、浸潤プロセスにおいて、浸潤の先頭に位置している細胞の分化状態に着目し、分化・未分化細胞の分布を定量的に調べた。

(3)ステップ③ グリオーマ幹細胞の浸潤に対する間質流の影響

腫瘍血管は透過性が高いことが知られており、がん細胞は常に間質流に晒された環境にあると考えられている。そこで、本研究においてグリオーマ幹細胞に間質流を負荷した場合に、分化・未分化状態の細胞にそれぞれどのような影響を与えるのか、細胞形態や浸潤プロセスを調べた。特に、間質流が浸潤

速度、遊走形態、細胞接着タンパク質の発現にどのような影響を与えるのかという点に着目し、位相差顕微鏡および共焦点レーザー顕微鏡による画像解析によって検討した。

(4) ステップ④ 血管内皮細胞との相互作用の解析 (共培養モデルへの展開)

グリオーマの浸潤と血管の位置には密接な関係があると考えられている。そこで、一方の流路にグリオーマ幹細胞、もう一方に血管内皮細胞を播種することで共培養モデルを構築し、グリオーマ-血管相互作用を定量的に解析した。

4. 研究成果

(1) マイクロ流体デバイスの作製とグリオーマ幹細胞の三次元浸潤モデル構築

マイクロ流体デバイスを用いてグリオーマ幹細胞の培養を行った。マイクロ流体デバイスはマイクロ流路パターンを転写したシリコーンゴムとカバーガラスをプラズマ接着することによって作製し、細胞の足場にコラーゲンゲル、フィブリンゲルを用いた。マイクロ流体デバイスに播種された細胞はゲル表面に接着し、三次元ゲル内部に浸潤する様子が観察された。

(2) グリオーマ幹細胞の分化・未分化状態と浸潤形態の定量的評価

培養液へ添加する因子を調整することによってグリオーマ幹細胞の分化・未分化状態を調節し、三次元浸潤形態やプロセスにどのような影響を及ぼすのか調べた。この時、静置培養 (static) をコントロール条件とし、間質流方向に遊走する条件 (forward) およびその逆方向の条件 (reverse) について検討した。その結果、培養3日目まで観察すると、幹細胞条件では forward 条件において他の条件よりも有意に浸潤距離が増加した (図1)。さらに、分化誘導条件では、その差が検挙になり、forward 条件は static および reverse 条件に比べて浸潤距離が顕著に増加した (図2)。この時、間質流の有無で浸潤距離に差が生じただけでなく、forward 条件と reverse 条件の間にも差が生じたことから、間質流の有無のみならず、間質流の向きも浸潤に影響を与えることが明らかになった。特に、本研究で用いたグリオーマ幹細胞は分化誘導条件において間質流への応答が顕著になる。

(3) グリオーマ幹細胞の浸潤に対する間質流の影響

生体内においてがん細胞は常に間質流に晒された環境にあると考えられている。そこで、本研究ではマイクロ流体デバイスを用いてグリオーマ幹細胞に間質流を负荷した場合に、細胞形態や浸潤プロセスに与える影響を調べた。特に、間質流の強さを検討した結

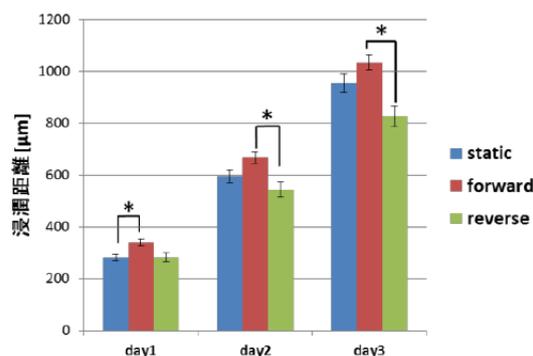


図1 幹細胞条件における浸潤距離の定量的評価

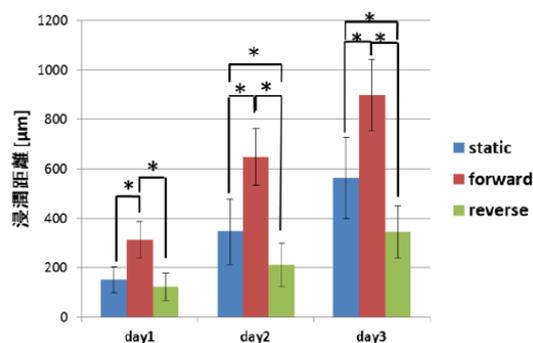


図2 分化誘導条件における浸潤距離の定量的評価

果、分化誘導細胞に液面差 2.5、5、10 mm に相当する3種類の間質流を负荷すると、最も強い間質流において浸潤距離が有意に増加することがわかった。次に、腫瘍周囲の環境を模擬したさらに強い間質流として液面差 20 mm で実験を行った。その結果、液面差 20 mm に起因する強い間質流では、グリオーマ幹細胞の浸潤が促進されるだけでなく、培養3日目までにゲルが溶解され、一部崩壊の様子が観察された。

強い間質流を负荷した際にグリオーマ幹細胞がゲルを溶解する現象が確認されたことから、グリオーマ幹細胞がタンパク質分解酵素を発現していることが示唆された。そこで、本研究で用いたマトリゲルの成分1つである IV 型コラーゲンを溶解する酵素である MMP-9 に着目し、その発現を免疫蛍光染色によって調べた。その結果、液面差 20 mm に起因する強い間質流では、グリオーマ幹細胞の浸潤において MMP-9 が強く発現していることが明らかになった。

(4) 血管内皮細胞との相互作用の解析 (共培養モデルへの展開)

グリオーマの浸潤と血管の位置には密接な関係があると考えられている。そこで、本研究ではマイクロ流体デバイスを用いてグリオーマ幹細胞と血管内皮細胞の共培養モデルを構築した。その結果、共培養において

グリオーマ幹細胞の浸潤能力が有意に上昇することが明らかになった (図3)。また、共培養条件では、単独培養において観察されていた細胞塊の形成が抑制されることがわかった (図4)。

さらに、この現象のメカニズムを定量 PCR 法によって検討したところ、グリオーマ幹細胞は血管内皮細胞と共培養することによって、Integrin $\alpha 2$ と Integrin $\beta 3$ の発現が有意に上昇することが分かった。さらに、これらの Integrin に結合する Collagen II $\alpha 1$ や Vitronectin などの細胞外基質の発現も上昇していた。これらの結果から、グリオーマ幹細胞は血管との相互作用により、Integrin の発現を上昇させると共に、それらに対応する細胞外基質のリモデリングを行うことで浸潤能力を獲得していることを示唆している。以上の結果は、英語投稿論文としてまとめ、現在査読中である。

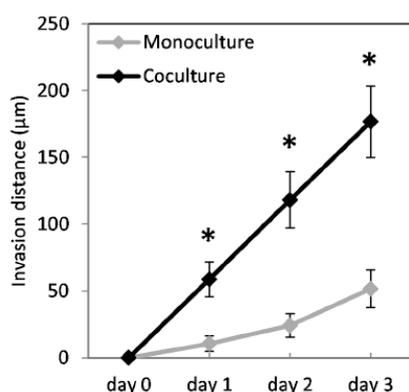


図3 共培養における浸潤距離の定量評価

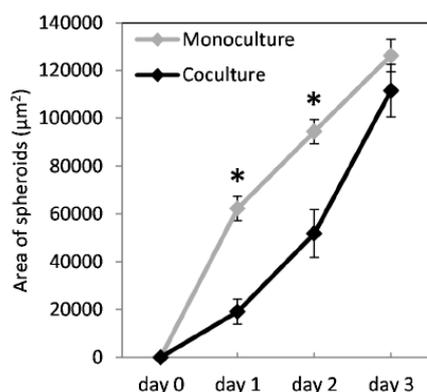


図4 共培養における細胞塊形成の定量評価

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 10 件)

①須藤亮、微小培養環境制御に基づく 3 次元組織工学と細胞バイオメカニクス、次世代バイオ・医療技術研究会、2017 年 3 月 31 日、東京大学生産技術研究所 (東京都目黒区)

②長南友太、須藤亮、グリオーマ幹細胞の浸潤形態に与えるヒアルロン酸の影響、シンポジウム：細胞アッセイ技術の現状と将来、2017 年 1 月 31 日、東京大学生産技術研究所 (東京都目黒区)

③難波尚子、須藤亮、間質流がグリオーマ幹細胞の浸潤能力に与える影響とそのメカニズムの評価、日本機械学会 第 29 回バイオエンジニアリング講演会、2017 年 1 月 19~20 日、愛知県産業労働センター ウィンクあいち (愛知県名古屋市)

④Yuta Chonan, Sotaro Taki, Ryo Sudo, Effect of endothelial cells on invasion of glioma initiating cells in a microfluidic platform, IEEE EMBS Micro and Nanotechnology in Medicine Conference, 2016 年 12 月 12~16 日, Hilton Waikoloa Village, Waikoloa (USA)

⑤長南友太、多木壮太郎、須藤亮、血管内皮細胞がグリオーマ幹細胞の浸潤に与える影響、生体医工学シンポジウム 2016、2016 年 9 月 17~18 日、旭川市大雪クリスタルホール 国際会議場 (北海道旭川市)

⑥須藤亮、オンチップがんモデル、細胞アッセイ研究会シンポジウム 細胞アッセイ技術の現状と将来、2016 年 1 月 19 日、東京大学生産技術研究所 (東京都目黒区)

⑦多木壮太郎、難波尚子、長南友太、須藤亮、グリオーマの浸潤プロセスにおける血管内皮細胞の影響、日本機械学会 第 28 回バイオエンジニアリング講演会、2016 年 1 月 9~10 日、東京工業大学 (東京都目黒区)

⑧Naoko Namba, Sotaro Taki, Ryo Sudo, The effect of interstitial flow on the invasion ability and morphology of glioma stem cells, 8th Asian-Pacific Conference on Biomechanics, 2015 年 9 月 16~19 日, Hokkaido University (北海道札幌市)

⑨Naoko Namba, Sotaro Taki, Ryo Sudo, The evaluation of glioma invasion ability under interstitial flow conditions, 37th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, 2015 年 8 月 25~29 日, Milano Conference Center, Milano, Italy

⑩難波尚子、多木壮太郎、須藤亮、グリオーマ幹細胞の浸潤プロセスにおける間質流の影響の評価、第 54 回日本生体医工学会大会、2015 年 5 月 7~9 日、名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市)

[その他]

慶應義塾大学理工学部システムデザイン工学科須藤研究室ホームページ

<http://www.sudo.sd.keio.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

須藤 亮 (SUDO RYO)

慶應義塾大学・理工学部・准教授

研究者番号：20407141