

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 26 日現在

機関番号：13802

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15413

研究課題名(和文) ナノスーツ法を用いた癌研究：電子顕微鏡で生きたまま細胞を観察する新しい技術

研究課題名(英文) A noble finding of tumor invasion using scanning electron microscopy analysis based on NanoSuit

研究代表者

平川 聡史 (Hirakawa, Satoshi)

浜松医科大学・医学部・准教授

研究者番号：50419511

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：ナノスーツ法は、組織を固定せず、生きたまま走査型電子顕微鏡で観察する新しい技術である。本応募課題の目的は、1．ヒト皮膚由来培養細胞をナノスーツ法で観察出来るかどうかを検討し、2．悪性黒色腫細胞を3次元癌間質モデルに応用し、ナノスーツ法で癌細胞の浸潤能を測定し、3．癌細胞に対する分子標的薬の効果を、ナノスーツ法に立脚して評価することである。従来、電子顕微鏡の観察試料は化学固定し、金属を蒸着していた。このため、皮膚や細胞が持つ瑞々しさを観察することは出来なかった。しかし、ナノスーツ法は、界面活性剤などで組織表面に皮膜を形成するため、表面構造を保ちつつ、培養環境の組織や細胞を生きたまま観察した。

研究成果の概要(英文)：Cancer cells migrate to interstitial matrix in tumor microenvironment. Furthermore, tumor cells metastasize to regional lymph nodes and/or distant organs including lung. Importantly, those cells migrate in tumor-associated lymphatic vessels, and are drained to the lymph nodes, leading to the formation of metastatic foci by the tumor cells. However, little is known about the process how tumor cells infiltrate and migrate in the lymphatic endothelial cells. Here we demonstrated the process by subjecting the materials to an electron microscopy analysis using NanoSuit, which is a nano-sized membrane polymerized on biomaterials including cell membrane. A375, a cell line from human malignant melanoma, interacts with mesenchymal cells such as endothelial cells. Therefore, we developed a three-dimensional tissue culture system to demonstrate lymphatic endothelial cells with A375 by scanning electron microscopy, and successfully found that those cells interact in a living condition.

研究分野：皮膚科学

キーワード：がん細胞 電子顕微鏡 内皮細胞 浸潤 治療モデル

1. 研究開始当初の背景

従来、電子顕微鏡による皮膚の観察は透過型電子顕微鏡(TEM)を用いて行うのが一般的である。しかし、TEMを用いた観察法では、皮膚が本来持つ瑞々しい構造を観察したり、生理的な働きを測定したりすることは出来ない。その理由は、化学固定で試料を作成し、樹脂に包埋して観察するからである。今後ありのままに皮膚を観察し、機能を評価するためには、迅速かつ簡便な手法を新たに開発する必要がある。

ナノスーツ®法は、生きたまま生体を観察する新たな電子顕微鏡技術である。本法は、本研究の共同研究者が昆虫を用いて世界に先駆けて報告した(Takaku et al. *PNAS* 2013)。ナノスーツ®法は、電子線やプラズマを用いて生体表面に 50 nm 前後の皮膜を形成する方法である。この手法を用いると生物試料を化学固定せず、生きたまま走査型電子顕微鏡(SEM)で観察することが出来る。従来、皮膚の表面を SEM で観察することは、ほぼ不可能であった。その理由は、試料作成の過程で角層の脂質が失われ、構築が乱れてしまうからである。そこで本研究では、まずナノスーツ®法を培養ヒト皮膚モデルに応用し、有用性を検討した。この結果、角層の構築をほぼ忠実に観察することが可能になり、病的变化を詳細に検討出来ることを見出した。

次に、研究室では皮膚に原発する悪性腫瘍がリンパ管に浸潤・転移する分子機構について検討を試みた。ナノスーツ®法は、癌細胞を生きたまま観察することが可能である。そこで、本研究では癌細胞の浸潤過程をナノスーツ®法で観察し、電子顕微鏡を用いたリアルタイム・イメージングを着想し、新たな評価系の構築に着手した。

2. 研究の目的

ナノスーツ®法は、組織を固定せず、生きたまま走査型電子顕微鏡で観察する新しい

技術である。本研究の目的は、1. ヒト皮膚由来培養細胞をナノスーツ®法で観察出来るかどうかを検討し、2. 悪性黒色腫細胞を 3次元癌間質モデルに応用し、ナノスーツ®法で癌細胞の浸潤能を測定し、3. 癌細胞に対する分子標的薬の効果を、ナノスーツ®法に立脚して評価することである。

従来、電子顕微鏡の観察試料は化学固定し、金属を蒸着していた。このため、皮膚や細胞が持つ瑞々しさを観察することは出来なかった。しかし、ナノスーツ®法は、界面活性剤などで組織表面に皮膜を形成するため、表面構造を保ちつつ、組織や細胞を生きたまま観察出来る可能性がある。そこで、本研究ではナノスーツ®法を皮膚の観察と癌研究に応用し、その有用性を明らかにすることに取り組んだ。

3. 研究の方法

3 - 1 . 3次元癌間質モデルの構築

24 穴のチャンバーを用いて培養系を作成した。まず、初代培養のヒト正常線維芽細胞をフィルターに播種した。その後、初代培養のヒト皮膚由来リンパ管内皮細胞を播種した。細胞は、ウシ血清存在下の組織培養液で培養した。培養後、フィルター上には少なくとも二層以上の培養細胞が構築されており、表面にはリンパ管内皮細胞が敷石状に配列される。リンパ管内皮細胞の局在は、リンパ管内皮細胞に特異的な抗体を用いて観測した。

次に、悪性黒色腫細胞株 A375 を培養し、3次元培養の表面に播種した。この結果、黒色腫細胞とリンパ管内皮細胞の相互作用を生きたまま観察することが可能になった。

3 - 2 . ナノスーツ®法による 3次元癌間質モデルの観察

ナノスーツ®は、生体や組織あるいは細胞表面に界面活性剤や溶液に存在する高分子

を塗布し、電子線やプラズマを照射することによりエネルギーを与え、高分子が重合されることにより形成された薄膜である。ナノスーツ®が存在すると、細胞表面からの水分の喪失が抑制されるため、真空状態でも細胞内には水分が保持される。この特徴を活用して、細胞を処理した後、SEM で観察すると、生きたまま電子顕微鏡で細胞の形態を詳細に観察することが出来る。

本研究では、黒色腫細胞 A375 をリンパ管内皮細胞の表面に播種し、相互作用した後、ナノスーツ®法で 3 次元培養組織を観察した。リンパ管内皮細胞を事前に金コロイドで標識することにより、悪性黒色腫細胞とリンパ管内皮細胞を分別した。この一連の観察により、リンパ管内皮細胞に対する黒色腫細胞 A375 の浸潤様式を詳細に観察することが出来るようになった。

3 - 3 . 分子標的薬による細胞浸潤の抑制効果：ナノスーツ®法による観測

ソラフェニブ 10 μM 存在下、悪性黒色腫細胞 A375 で培養した。この後、A375 を 3 次元癌間質モデルに応用し、3 次元培養モデルを構築するリンパ管内皮細胞表面に播種し、相互作用を促した。その後、3 次元癌間質モデルを SEM で観測し、細胞が生きたまま相互作用を評価した。

4 . 研究成果

4 - 1 . 皮膚悪性黒色腫細胞株の観察

ナノスーツ®法を用いて、無固定のまま培養細胞を電子顕微鏡で観察した。本研究では、皮膚悪性黒色腫細胞株 A375 を用いて観測を行った。A375 には、マウスに皮下移植した際に高い転移能を示す A375(SM)と、転移能を示さない A375(P)がある。二つの細胞株は転移能に明らかな差がある一方、その形態的な違いは光学顕微鏡レベルでは不明である。そこで、本研究ではナノスーツ®法を用いて、電子顕微鏡レベルで SM 株と P 株の差異を検討

した。本研究では、走査型電子顕微鏡 S-4800(HITACHI)を用いて観測を行った。この結果、転移株(SM)と非転移株(P)は、糸状仮足の形成が異なることを見出した。A375 では、転移株で仮足形成が著しく亢進しており、浸潤・転移能を反映していることが示唆された。この細胞レベルの知見は、ナノスーツ®法で初めて同定した成果である。

4 - 2 . 3 次元癌間質モデルの構築

癌細胞が浸潤する間質組織を、培養ヒト皮膚線維芽細胞を用いて立体的に構築した。3 次元培養の技術は当該研究室で確立しており、表皮モデルあるいは内皮細胞を内包した脈管モデルを構築することが可能である。

皮膚悪性黒色腫が浸潤・転移しやすい組織の一つにリンパ管がある。そこで、本研究では、培養ヒトリンパ管内皮細胞を用いて 3 次元間質組織を構築し、生きたまま SEM で観測した。ナノスーツ®法を応用して免疫電顕を行うと、リンパ管内皮細胞を特異的に標識出来ることを見出した。本研究では、癌間質における細胞間相互作用を、一細胞レベルで特異的に観察することが可能になった。

4 - 3 . 黒色腫細胞の浸潤能：糸状仮足の観測

3 次元癌間質モデルにおける A375 の形態変化をナノスーツ®法で観察し、浸潤過程をリアルタイムに評価した。癌微小環境では、癌細胞と間質の構成細胞が相互に作用する。この結果、癌細胞は間質へ浸潤する。合成樹脂のフィルター上では、A375 の転移株(SM)と非転移株(P)は類円形であり、互いに相同である。しかし、間質に対する浸潤性は異なる可能性がある。そこで本研究では、3 次元癌間質モデルで浸潤過程を観察した。この結果、転移株と非転移株では形態変化が著しく異なることを見出した。すなわち、細胞骨格の変化と糸状仮足の形成が浸潤能の指標とな

る可能性を、生きた細胞を観察することから見出した。

4 - 4 . 治療標的の同定と薬剤効果の評価

細胞骨格の扁平化と糸状仮足の形成を治療標的として捉え、A375SM の間質浸潤を抑制する治療モデルの作成に取り組んだ。ソラフェニブは Raf を阻害する分子標的薬であり、代表的なマルチキナーゼ阻害薬の一つである。ソラフェニブは、A375 転移株(SM)でも Raf-MAPK シグナルを阻害し、細胞の浸潤能を抑制する可能性がある。そこで、本研究では、A375 転移株をソラフェニブで前処理した。その後、A375 転移株を 3 次元癌間質モデルへ播種してナノスーツ®法で観察すると、糸状仮足の形成には形態学的な変化が現れた。この結果は、細胞骨格の扁平化と糸状仮足の形成が A375 の浸潤能の指標となることを裏付けるものである。

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)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Takaku Y, Suzuki H, Kawasaki H, Ohta I, Ishii D, Hirakawa S, Tsutsui T, Matsumoto H, Takehara S, Nakane C, Sakaida K, Suzuki C, Muranaka Y, Kikuchi H, Konno H, Shimomura M, Hariyama T. A modified 'NanoSuit®' preserves wet samples in high vacuum: direct observations on cells and tissues in field-emission scanning electron microscopy. *R Soc Open Sci.* 2017 Mar 1;4(3):160887. doi: 10.1098/rsos.160887.

〔学会発表〕(計 1 件)

1. Hirakawa S. Role of angiogenesis and lymphangiogenesis in tumor development. The 14th International Symposium of the Cutaneous Research at Yonsei University. South

Korea, September 3, 2016.

〔図書〕(計 1 件)

1. Detmar M, Hirakawa S. Vascular Biology. Bologna JL, Schaffer JV, Cerroni L, eds. *Dermatology* 4th edition, Elsevier, pp1775-1785, 2018.

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称: "含水状態の生物試料の電子顕微鏡観察用保護剤、電子顕微鏡観察用キット、電子顕微鏡による観察、診断、評価、定量の方法並びに試料台".

発明者: 針山孝彦, 高久康春, 鈴木浩司, 平川聡史, 河崎秀陽, 下村政嗣, 石井大佑, 太田 勲, 村中祥悟.

権利者: 科学技術振興機構

種類: 特許

番号: PCT/JP2015/052404

出願年月日: 2015 年 1 月 28 日

国内外の別: 国外

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

平川 聡史 (HIRAKWA, Satoshi)

浜松医科大学・医学部・准教授

研究者番号: 50419511

(2)研究分担者 なし

()

研究者番号:

(3)連携研究者

針山 孝彦 (HARIYAMA, Takahiko)
浜松医科大学・光先端医学教育研究センター・特任教授
研究者番号：30165039

高久 康春 (TAKAKU, Yasuharu)
浜松医科大学・光先端医学教育研究センター・特任助教
研究者番号：60378700

太田 勲 (OHTA, Isao)
浜松医科大学・光先端医学教育研究センター・技術専門職員
研究者番号：20464133

石井 大佑
(ISHII, Daisuke)
名古屋工業大学・工学部・准教授
研究者番号：60435625

(4)研究協力者 なし