

令和元年5月27日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04233

研究課題名(和文) 間葉系幹細胞との相互作用で悪性化(高浸潤化)が促進するがん細胞の浸潤機構の解明

研究課題名(英文) Experimental study for invasive mechanism of tumor cells stimulated by mechanical interactions between tumor cells and mesenchymal stem cells

研究代表者

森田 康之(Morita, Yasuyuki)

熊本大学・大学院先端科学研究部(工)・教授

研究者番号：90380534

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：がん細胞は、周囲の細胞(CAF: Cancer-Associated Fibroblast)が産生するサイトカインのみの影響を受ける場合、がん細胞単体で存在するときと比べて、牽引力は変化しないが、糸状仮足とみられる仮足を伸ばして浸潤する形態を示した。一方、そのサイトカインのみでなく、がん細胞周辺にそのサイトカインを産生するCAFを存在させると、牽引力は亢進し、さらに葉状仮足とみられる仮足を発達させ浸潤する挙動を示した。すなわち、がん細胞は、周囲の細胞(CAF)およびそれらが産生するサイトカインの影響を受け、その浸潤力学場および浸潤挙動を大きく変化させることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの研究では、周囲の細胞(CAF: Cancer-Associated Fibroblast)が産生するサイトカインが、がん細胞に生化学的な作用を及ぼすことはわかっていた。本研究は、そのサイトカインの生化学的作用ばかりでなく、物理的な作用を明らかにすることに成功した。さらには、それを産生するCAFの物理的存在が、がん細胞の浸潤機構に大きな影響を与えることも明らかにした。これは、CAFによる周囲の細胞外マトリックス構造の再編が浸潤に影響を与えるものと考えられる。これらの結果は、がん転移の抑制・制御を目指す創薬分野において、非常に有用な結果である。

研究成果の概要(英文)：When cancer cells are affected by the cytokine alone secreted from CAFs (Cancer-Associated Fibroblasts) which exist around the cancer cells, the cancer cells migrate into a 3D collagen gel using the filopodia, while the traction force generated by the cancer cells isn't changed compared to the cancer cells which exist alone in the gel. On the other hand, when the cancer cells are affected by not only the cytokine but the CAFs, they migrate into the gel using the lamellipodia, and the traction force is increased. In summary, this project has found that the invasive dynamic field of the extracellular matrix surrounding the cancer cells and the migration behavior of the cancer cells are highly dependent upon the cytokine secreted from CAFs and the existence of the CAFs.

研究分野：バイオメカニクス

キーワード：がん がん細胞 転移 浸潤 力学場 細胞外マトリックス がん関連線維芽細胞 CAF

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

#### 1. 研究開始当初の背景

(1) わが国では、1981年以降、死亡原因の一位はがんである。この傾向は、先進諸国でも同様であり、がんの根絶は世界レベルでの喫緊の課題といえる。

(2) がんによる死亡の9割は転移によるものである。転移は、原発巣を形成するがん細胞が周囲の細胞外マトリックスへ飛び出し遊走する、がん細胞と細胞外マトリックスの力学的相互作用である。

(3) 最近、この力学的相互作用の亢進に、がん細胞周囲の間質細胞(線維芽細胞、幹細胞、免疫細胞、内皮細胞など)が大きな影響を及ぼすことがわかってきた。

#### 2. 研究の目的

(1) 本研究では、間質細胞のがん関連線維芽細胞(CAF: Cancer Associated Fibroblast)に着目する。

(2) CAFが、がん細胞の浸潤挙動に与える影響について検討する。

(3) その中で、CAF自身の存在が重要であるのか(物理的作用)、CAFが産生するサイトカインのみ重要であるのか(化学的作用)について検討する。

#### 3. 研究の方法

(1) 細胞には、がん細胞として侵襲性膀胱がん細胞(SUIT-2)、およびがん関連線維芽細胞(CAF)を用いた。がん細胞は、事前の遺伝子操作により自家蛍光示す。

(2) CAFの化学的・物理的影響を調べるため、次の三条件でのがん細胞について評価した。すなわち、条件1: がん細胞のみ、条件2: CAFが産生するサイトカインとがん細胞、条件3: CAFとそれが産生するサイトカインおよびがん細胞。ちなみに、いずれの条件も細胞総数は同一であり、CAFと混合する際は1:1とした。

(3) 三次元培養状態を実現するため、三次元コラーゲンゲルを作製する際、条件に応じて、上記がん細胞とCAFを混合するとともに、直径500nmの蛍光ビーズを分散させ、ゲルに包埋した。

(4) 評価には、がん細胞の三次元形態とがん細胞が周囲のコラーゲンゲルに形成する力学場を用いた。

(5) がん細胞の三次元形態評価には、共焦点レーザー顕微鏡で自家蛍光するがん細胞を記録し、形状を抜き取った。

(6) がん細胞の力学場評価には、共焦点レーザー顕微鏡でゲル中に分散させた蛍光ビーズの動きを経時的に記録し、三次元ボリューム相関(Digital Volume Correlation)法で変形場を算出した。

#### 4. 研究成果

(1) これまでの研究では、三次元培養下での細胞の適切な形状評価法がなかったため、本研究において新しく尖鋭距離、3Dアスペクト比を定義・導入し、三次元培養下での細胞の形態的特徴の抽出に成功した。

(2) その形状評価では、条件1のがん細胞を基準として、条件2のがん細胞は細長い糸状仮足のような仮足を成長させ遊走したが、条件3のがん細胞は葉状仮足のような仮足を発達させ遊走した。

(3) 力学場評価では、三次元のコラーゲンゲル中で培養するがん細胞が形成する浸潤力学場の経時的な定量計測に成功した。

(4) その浸潤力学場から、がん細胞が細胞外マトリックスのコラーゲンゲルに及ぼすトラクションフォースを算出すると、条件2のがん細胞が発生する力を基準として、条件3のがん細胞ではほぼ変化がなかったが、条件3のがん細胞では発生する力が2倍程度増加した。

(5) がん細胞は、CAFが産生するサイトカインによって浸潤挙動を変化させることがわかつ

たが、そればかりでなく、CAF自身ががん細胞周辺に物理的に存在する場合には、サイトカインのみの影響とはまた異なった浸潤挙動を表出することがわかった。

(6) これは、CAFががん細胞の転移に大きな影響を与えることを示唆している。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 6件)

Y. Morita, R. Sakurai, T. Wakimoto, K. Kobayashi, B. Xu, Y. Toku, G. Song, Q. Luo, Y. Ju, “ tLyP-1-conjugated core-shell nanoparticles,  $Fe_3O_4@mSiO_2$ , for tumor-targeted drug delivery,” Applied Surface Science, 査読有, Vol.474, pp.17-24, 2019.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2018.09.205>

Y. Morita, T. Yamauchi, Y. Toku, Y. Ju, “ DVC measurement of invasive deformation field of ECM generated by tumor cell induced EMT,” Proceedings of the 2018 SEM Annual Conference and Exposition on Experimental and Applied Mechanics, 査読無, Paper No.84, 2018.

Y. Morita, T. Yamashita, Y. Toku, Y. Ju, “ Optimization of differentiation time of mesenchymal-stem-cell to tenocyte under a cyclic stretching with a microgrooved culture membrane and selected measurement cells,” Acta of Bioengineering and Biomechanics, 査読有, Vol. 20, No. 1, pp.3-10, 2018.

DOI: 10.5277/ABB-00927-2017-04

Y. Morita, F. Matsubara, Y. Toku, Y. Ju, “ Use of a tendon/ligament cell sheet with mesenchymal stem cells and cyclic stretch stimulus for tendon/ligament tissue restoration,” Journal of Mechanical Engineering, 査読有, Vol. SI5, No.3, pp.1-11, 2018.

[https://jmeche.uitm.edu.my/wp-content/uploads/bsk-pdf-manager/1\\_SI\\_5\\_1\\_ID\\_081\\_344.pdf](https://jmeche.uitm.edu.my/wp-content/uploads/bsk-pdf-manager/1_SI_5_1_ID_081_344.pdf)

Y. Morita, N. Kawase, T. Yamauchi, Y. Ju, “ Measurement of 3D deformation field of ECM generated by mesenchymal stem cell using DVC method,” Proceedings of the SEM Annual 2017: Conference and Exposition on Experimental and Applied Mechanics, 査読無, Paper No.99, 2017.

Y. Morita, T. Sato, S. Watanabe, Y. Ju, “ Evaluation of precise optimal cyclic strain for tenogenic differentiation of MSCs,” Proceedings of the XIII International Congress Conference and Exposition on Experimental and Applied Mechanics, 査読無, Paper No.82, 2016.

[学会発表](計 14件)

森田康之, 山内崇司, 徳悠葵, 巨陽, “ がん転移における上皮間葉転換ががん細胞の4D浸潤力学場に及ぼす影響の解明,” 日本非破壊検査協会応力・ひずみ測定部門講演会, 2019.

Y. Morita, “ DVC measurement of invasive deformation field of ECM generated by cancer cell with/without EMT,” The 2018 Engineering Workshop in Kumamoto, 2018.

Y. Morita, T. Yamauchi, Y. Toku, Y. Ju, “ DVC measurement of invasive deformation field of ECM generated by tumor cell induced EMT,” 2018 SEM Annual Conference and Exposition on Experimental and Applied Mechanics, 2018.

森田康之, 山本陵介, 徳悠葵, 巨陽, “ 異なる細胞外基質弾性率での幹細胞分化過程における力学場計測,” 日本機械学会 2018年度年次大会, 2018.

Y. Morita, F. Matsubara, Y. Toku, Y. Ju, “ Use of a tendon/ligament cell sheet with mesenchymal stem cells and cyclic stretch stimulus for tendon/ligament tissue restoration,” Malaysia-Japan Joint Symposium on Biomechanics & Medical Engineering 2017: International Conference on Advances in Mechanical Engineering 2017 (ICAME2017), 2017.

Y. Morita, N. Kawase, T. Yamauchi, Y. Ju, “ Measurement of 3D deformation field of ECM generated by mesenchymal stem cell using DVC method,” SEM Annual 2017: Conference and Exposition on Experimental and Applied Mechanics, 2017.

平野勇勝, 森田康之, 徳悠葵, 巨陽, “ 伸縮刺激を用いた間葉系幹細胞の腱細胞分化における繰り返し周波数の影響に関する研究,” 日本機械学会第28回バイオフロンティア講演会, 2017.

中野優亮, 森田康之, 山内崇司, 徳悠葵, 巨陽, “ DVC法を用いたがん細胞スフェロイドの浸潤力学場計測,” 日本機械学会 M&M2017 材料力学カンファレンス, 2017.

梅井航, 森田康之, 徳悠葵, 巨陽, “ デジタル画像相関法を用いた伸展下における細胞内力学場計測,” 日本機械学会 2017年度年次大会, 2017.

山内崇司, 森田康之, 徳悠葵, 巨陽, 河瀬直樹, “ がん細胞の浸潤力学場に上皮間葉転換が及ぼす影響の4次元DVC計測,” 日本機械学会第29回バイオエンジニアリング講演会,

2017.

東浦功治, 森田康之, 佐藤俊博, 徳悠葵, 巨陽, “間葉系幹細胞の腱組織構築に対するひずみ依存性,” 日本機械学会第 27 回バイオフィロントニア講演会, 2016.

山本陵介, 森田康之, 山内崇司, 徳悠葵, 巨陽, “DVC 法を用いた幹細胞分化時における細胞外基質の 3 次元力学場計測,” 日本機械学会 M&M2016 材料力学カンファレンス, 2016.

森田康之, 山下貴大, 巨陽, “力学刺激での腱分化過程におけるタンパク質発現の 1 細胞計測に関する研究,” 日本機械学会 2016 年度年次大会, 2016.

Y. Morita, T. Sato, S. Watanabe, Y. Ju, “Evaluation of precise optimal cyclic strain for tenogenic differentiation of MSCs,” XIII International Congress Conference and Exposition on Experimental and Applied Mechanics, 2016.

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：水谷 武臣

ローマ字氏名：(MIZUTANI, Takeomi)

所属研究機関名：北海学園大学

部局名：工学部

職名：教授

研究者番号 (8 桁)：40451405

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。