

平成30年6月14日現在

機関番号：12501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14485

研究課題名(和文)階層的微細加工ハイドロゲルを用いる癌細胞浸潤評価系の開発

研究課題名(英文)Development of Assay Systems for Cancer Cell Invasion Using Microfabricated Hierarchical Hydrogels

研究代表者

関 実 (Seki, Minoru)

千葉大学・大学院工学研究院・教授

研究者番号：80206622

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、癌細胞の環境を生体外において再現し、癌細胞の浸潤挙動や抗癌剤効果の正確な評価を可能とする、新規3次元細胞培養系の開発を目指した。マイクロ流路技術を用いて、軟部および硬部からなる階層的な微小ハイドロゲル材料(ハイドロゲルファイバーおよびハイドロゲルシート)を作製し、その内部に癌細胞と正常細胞を正確に配置して培養した。ハイドロゲルの硬さを調節し、また栄養分の供給方向を制御することで、癌細胞の浸潤を一定方向に誘導し、浸潤度合の定量評価を可能とする新規システムを開発した。本研究で作製したハイドロゲル材料は、癌の診断や新規抗がん剤の開発において有用なツールとなりうると期待される。

研究成果の概要(英文)：We have developed new 3D culture platforms for cancer cells, which are capable of reproducing the in vivo cancer cell environments and evaluating the cancer cell invasion and anticancer drug efficacy. Microfluidic technologies have been utilized to produce hierarchically patterned hydrogels (fibers and sheets), in which cancer cells and normal cells were precisely organized. Guidance of invasion direction and its quantitative evaluation were possible, by tuning the hydrogel stiffness and controlling the direction of nutrition supply. The presented systems would be useful as new tools for cancer cell diagnosis and development of new anticancer drugs.

研究分野：生物化学工学

キーワード：細胞培養 マイクロ流路 ハイドロゲル 癌細胞 抗ガン剤 癌浸潤 スクリーニング

## 1. 研究開始当初の背景

癌治療のためのミセル化抗癌剤や抗体医薬品の開発、マイクロ RNA を利用する癌の早期診断手法の発展などに代表されるように、近年、癌に対する医学的技術の発展は目覚ましく、また癌幹細胞や循環癌細胞の分子生物学的解明も急速に進進しつつある。そのような新規研究開発において、生体内における癌細胞の環境を正確に再現したモデルを利用することは、極めて有用であり、また必要であると言える。これまでに、癌細胞の集塊形成 (Okochi, Lab Chip, 2009, 3378 など) や、がん細胞と正常細胞の共培養技術 (Kamm, Biomaterials, 2014, 2454 など) などを利用することで、癌細胞の浸潤挙動や薬剤への応答挙動を観察する手法は数多く報告されてきた。しかしながら癌細胞は、(1) 3 次元的环境において、(2) 他の正常な細胞と密接に相互作用し、(3) また適切な細胞外マトリックス (ECM) 成分に取り囲まれながら、(4) 酸素や栄養分の豊富な方向へと浸潤 (増殖 + 移動) し、(5) 最終的に血流に乗って他の臓器へと転移する、という特性を有しており、これらをすべて同時に生体外において再現するシステムは、本研究の開始時点で報告されていなかった。

## 2. 研究の目的

そこで本研究では、生体内における癌細胞の環境を再現する新規細胞培養手法の開発を目的として、微細加工ハイドロゲル材料を利用した新規プロセスの開発を目的とした。具体的には、まず、マイクロ流体デバイスを用いて階層的なファイバー状あるいはシート状のハイドロゲル材料 (図 1) を作製し、その内部の特定の位置に癌細胞と正常細胞を配置する手法を開発することとした。その際に、細胞接着性を有する ECM 成分をハイドロゲルの成分として導入することで、生体内の化学的環境を再現することを目指した。そのようなハイドロゲルの内部において、癌細胞は周囲の細胞と相互作用を及ぼしあいながら、ハイドロゲル外へと浸潤する。その際に、階層的なハイドロゲルの中で浸潤の“スタート位置が一定”となり、さらに浸潤が一方方向へと“誘導”されることによって、浸潤度合を正確かつ簡便に定量評価できるものと予想された。そこで本研究では、本培養系と生体組織の類似性を確認した上で、3 次元的环境において癌細胞の浸潤挙動や血管新生挙動を再現できるかどうかについて、明らかにすることとした。さらに、この系を抗癌剤の薬効評価のための新規モデルとして応用することとした。以上の検討を通して、癌細胞の生体環境を物理・化学・生物学的に模倣した 3 次元培養系の、創薬や癌の検出における有用性を実証することを目指した。

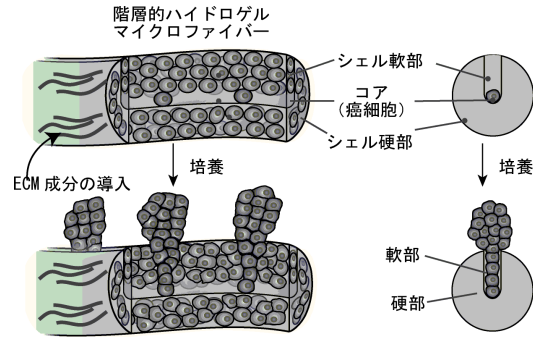


図 1. 階層的マイクロファイバーの例を示した模式図

## 3. 研究の方法

まず、ハイドロゲル作製のためのマイクロ流路の設計と作製を行い、実際のハイドロゲル中における癌細胞の浸潤挙動の評価を行った。ハイドロゲルの材料としてはアルギン酸を利用し、さらにコラーゲンなどの ECM 成分に含まれる細胞接着性のペプチドモチーフである RGD ペプチドによって修飾されたアルギン酸を利用した。階層的ファイバー状ハイドロゲルの作製においては、マイクロノズルアレイ構造を通して、組成の異なるアルギン酸 Na 水溶液を導入し、ノズルのパターンに応じた複合的な断面パターンを有するゲル材料の作製方法 (Kitagawa, Biofabrication 2014) を応用した (図 2)。中央 (コア) に癌細胞、シェルに正常細胞として線維芽細胞を導入し、シェル部に軟部を形成した複合型・階層的ハイドロゲルファイバーの作製を行った。

また、階層的シート状ハイドロゲルを作製するために、既報の技術 (Kobayashi, JBB, 2013) を応用し、3 層構造をとり、入口から導入された溶液が交互に分配され合流する流路構造を作製した。平面的なノズルの出口から、デバイス外部におけるゲル化剤水溶液 (例: 塩化カルシウム水溶液) 中に押し出すことによって、ストライプ状となった中層の内部に一定間隔で癌細胞を包埋し、上下層に正常細胞を含んだハイドロゲルシートを形成した。得られたファイバー状のアルギン酸材料については、培地中に懸濁させることで培養を行った。一方で階層的ハイドロゲルシートの場合にはコラーゲンゲルの上に添付して培地する手法を提案した。コラーゲンゲルから培地成分がシートに供給されることで、細胞の浸潤がゲル方向に誘導されることを目標とした。

ハイドロゲルの材料としては主にアルギン酸を利用したが、アルギン酸のみからなるゲルは強度が高すぎ、内部の細胞培養に適さないと考えられたため、ゲル化をしない誘導体であるアルギン酸プロピレングリコールを

一定の濃度で導入し、ハイドロゲルの物理的強度を部分的に調整した。マトリックスの組成の違いによって細胞の浸潤機能に変化が現れるかどうかについて、検証を行った。これらの実験において、癌細胞としては、ヒト肺癌由来がん細胞、メラノーマ由来がん細胞などの培養細胞を用いた。ファイバーの場合には主に肺癌細胞、シートの場合には黒色腫細胞を主に利用した。癌細胞の浸潤度合を評価する上で、「浸潤した（外部に到達した）細胞の数」を見積もる、というシンプルな戦略をとった。また、線維芽細胞との共培養、あるいは線維芽細胞由来のコンディション培地の添加が癌細胞の浸潤挙動や機能に与える影響を評価した。さらに特にファイバーの系においては、3種の抗がん剤（パクリタキセル、シスプラチン、5-FU）が癌細胞の浸潤に与える影響を評価した。

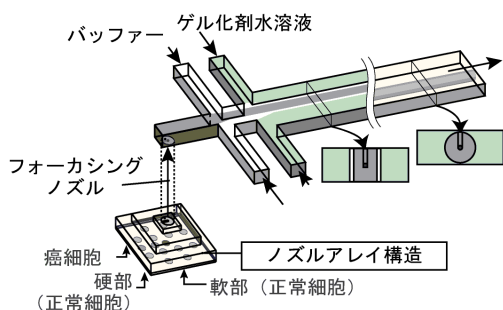


図2．階層的ハイドロゲルファイバー作製のためのマイクロ流体デバイスの模式図。

#### 4．研究成果

まず本研究に初年度にあたる平成28年度には、主にハイドロゲル作製のためのマイクロ流路の設計と作製を行い、実際のハイドロゲル中における癌細胞の浸潤挙動の評価を行った。階層的ファイバー状ハイドロゲルの作製においては、マイクロノズルアレイ構造を通して、組成の異なるアルギン酸Na水溶液を導入し、ノズルのパターンに応じた複合的な断面パターンを有するゲル材料の作製方法を応用した。中央（コア）に肺癌細胞、シェルに正常細胞として線維芽細胞を導入したところ、シェル部に形成した軟部を通じて、癌細胞が一定期間の培養後に外部へと浸潤することが確認でき、癌細胞の浸潤度合を、「浸潤した（外部に到達した）細胞の数」によって簡便に定量できることが明らかとなった。さらに抗がん剤を投与した場合の細胞の浸潤度合が変化することや、癌細胞の発現する遺伝子にも差異が生じることが確認された。

また階層的シート状ハイドロゲルの作製においては、3層構造をとり、入口から導入された溶液が交互に分配され合流する流路構

造を作製した。平面的なノズルの出口から、デバイス外部におけるゲル化剤水溶液中に押し出すことによって、ストライプ状となった中層の内部に一定間隔で癌細胞（メラノーマ）を包埋し、上下層に正常細胞を含んだハイドロゲルシートを形成することができた。得られたシートをコラーゲンゲルの上に静置したところ、細胞の浸潤が実際にゲル方向に誘導される様子が観察され、本手法の有用性を実証することができた（図3）。なお、これらの検討において、細胞接着性のペプチドを結合させたアルギン酸からなるハイドロゲルを用い、それによって癌細胞の浸潤が促進することを明らかにした。

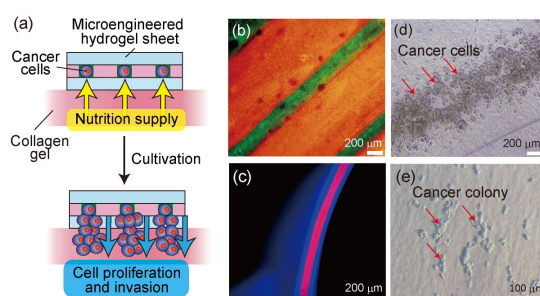


図3．階層的ハイドロゲルシートを用いた癌細胞の浸潤挙動評価。(a) コラーゲンゲル状での細胞培養の様子。(b, c) 3層かつストライプ状ハイドロゲルの蛍光顕微鏡写真（各層に異なる色の蛍光微粒子を導入）、(d, e) シート状ハイドロゲルの内部において増殖した黒色腫細胞および、コラーゲンゲル状に浸潤した細胞の顕微鏡写真。

さらに、本研究の2年目に当たる平成29年度は、初年度に構築した階層的ハイドロゲルの、がん細胞の浸潤挙動評価における有用性を追求するとともに、生体のがん細胞環境の再現を試みた。昨年度までに開発した複合型ファイバーについては、線維芽細胞増殖因子の添加によってがん細胞の浸潤が促進される一方、Rockインヒビターの添加によってがん細胞の浸潤が抑制される、という結果が得られたことから、細胞の遊走を総合的に評価できる系であることが確認された。この結果については、論文をLab Chip誌に投稿し、掲載された。さらに、がん細胞の浸潤に関わる遺伝子発現を定量評価し、共培養が抗がん剤の薬効に与える影響を評価することができた。これらの結果は、本手法が、既存の平面的な環境における手法とある程度の相関を示す一方で、3次元的な環境における評価を可能とする新しい手段であることを示すため、本実験系の有効性および汎用性を明らかにすることができたと考えられる。また、サンドイッチ状の階層的ハイドロゲルシートを利用した実験系については、コラーゲンゲル状に添付する培養系の確立を目指し、特に線維芽細胞のコンディション培地を用いて、がん細胞の浸潤が一定方向に制御できることを実証した。特に、がん細胞の浸潤は3次

元的な環境で進行する一方で、コラーゲンゲルに添付したハイドロゲルシートを剥離することで、観察環境を平面的なものに変換することができるため、簡便に、かつ正確に3次元環境におけるがん細胞の浸潤度合いを定量化できることが示された。一方で、土台となるコラーゲンゲルの内部に対するがん細胞の浸潤挙動は限定的であったため、今後は培養系の最適化によって、生体組織をより高度に模倣したがん細胞の浸潤アッセイ系の構築へと発展させたいと考えている。以上の結果より、本研究では、癌細胞の浸潤挙動を3次元環境において簡便かつ正確に定量評価できる新規手法を提案することができたと考えられる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

Micropassage-embedding Composite Hydrogel Fibers Enable Quantitative Evaluation of Cancer Cell Invasion under 3D Coculture Conditions, Manami Sugimoto, Yoichi Kitagawa, Masumi Yamada, Yuya Yajima, Rie Utoh, and Minoru Seki, Lab on a Chip, 18(9):1378-1387.  
DOI: 10.1039/C7LC01280B

Manami Sugimoto, Yoichi Kitagawa, Masumi Yamada, and Minoru Seki, Proceedings of the 20th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2016), 567-568 (2016).

〔学会発表〕(計7件)

微細加工ハイドロゲルシートを利用したがん浸潤評価系の開発  
杉本愛実, 北川陽一, 矢嶋祐也, 鶴頭理恵, 山田真澄, 関実  
シンポジウム: 細胞アッセイ技術の現状と将来 東京大学 生産技術研究所 2017年1月31日

がん細胞の浸潤方向制御を可能とするハイドロゲルシートの作製  
杉本愛実, 北川陽一, 矢嶋祐也, 鶴頭理恵, 山田真澄, 関実  
化学工学会第48回秋季大会 徳島大学 常三島キャンパス 2016年9月6日~8日

階層的ハイドロゲルシートを用いた細胞遊走の3次的制御と定量評価  
杉本愛実, 北川陽一, 山田真澄, 関実  
第23回HAB研究機構学術年会 つくば産業総合研究所中央第一 共用講堂 20

16年5月26~28日

微細加工ハイドロゲルシートを利用した細胞遊走評価系の開発  
杉本愛実, 北川陽一, 山田真澄, 関実  
化学とマイクロ・ナノシステム学会第33回研究会 東京大学生産技術研究所 2016年4月25~26日

Guidance and Evaluation of Cancer Cell Invasion by Open Air Culture System Using Microengineered Hydrogel Sheets, Manami Sugimoto, Yoichi Kitagawa, Masumi Yamada, and Minoru Seki, The 20th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2016), Dublin, Ireland, Oct. 9-13, 2016.

Control of Invasion Direction of Cancer Cells Using Hierarchically Patterned Hydrogel Sheets, Manami Sugimoto, Yoichi Kitagawa, Yuya Yajima, Rie Utoh, Masumi Yamada, and Minoru Seki, 28th 2017 International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science (MHS 2017), Nagoya University, Japan, Dec. 3-6, 2017.

Invasion Assay of Cancer Cells Using Hierarchically-patterned Hydrogel Sheets  
Manami Sugimoto, Yoichi Kitagawa, Yuya Yajima, Rie Utoh, Masumi Yamada, and Minoru Seki, RSC Tokyo International Conference 2017 - Analytical Technology Towards Future Society - (JASIS 2017), Makuhari Messe, Chiba, Japan, Sep. 7-8, 2017.

〔産業財産権〕

取得状況(計1件)

名称: 細胞評価用ハイドロゲル基材および細胞評価手法  
発明者: 山田真澄, 関実, 北川陽一  
権1利者: 国立大学法人千葉大学  
種類: 再公表特許  
番号: 特許第6296620号  
取得年月日: H30年3月2日  
国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等  
<http://chem.tf.chiba-u.jp/gacb01/>

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

関実 (SEKI, Minoru)  
千葉大学・大学院工学研究院・教授  
研究者番号: 80206622

(2)研究分担者

山田真澄 (YAMADA, Masumi)

千葉大学・大学院工学研究院・准教授

研究者番号： 30546784