

令和 2 年 6 月 29 日現在

機関番号：11301

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2017～2019

課題番号：16KK0138

研究課題名（和文）がん細胞の挙動制御に向けた時空間変化するがん微小環境の力学的特性の解明（国際共同研究強化）

研究課題名（英文）Investigation of mechanical properties of tumor microenvironment with spatial and temporal heterogeneity of oxygen tension for control of tumor cell behavior (Fostering Joint International Research)

研究代表者

船本 健一 (Funamoto, Kenichi)

東北大学・流体科学研究所・准教授

研究者番号：70451630

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 10,800,000円

渡航期間： 6ヶ月

研究成果の概要（和文）：がん微小環境におけるがん細胞とその周囲の細胞外マトリクスの力学的特性の変化に対し、時空間変化する酸素濃度が与える影響について研究を行った。細胞周囲の酸素分圧と細胞に対する力学的刺激および化学的刺激を厳密に制御して生体内微小環境を再現する「3-in-1生体模擬チップ」を開発して実験に用いた。コラーゲンゲル内に配置したヒト乳がん細胞（MDA-MB-231細胞）の増殖率や遊走速度は、低酸素下において常酸素下よりも増加したが、血管内皮細胞との共存培養下ではその酸素依存の挙動が不明瞭になった。また、共存培養下ではコラーゲンゲルの収縮が促進されたが、低酸素下では常酸素下よりも収縮速度は遅くなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん微小環境では、細胞群の過剰な増殖により慢性的かつ不均一な低酸素状態が生成されるとともに、未成熟な血管網の形成に起因して一過性の低酸素負荷と再酸素化が生じる。本研究では、酸素濃度の変化が、がん細胞やその周囲の細胞外マトリクスの力学的特性と、それらの間の相互作用に与える影響の一端を解明した。本研究で観察された酸素濃度に依存する微小環境における現象は、がんの増殖と転移の問題に限らず、様々な疾患の予防や治療、再生医療の進展に重要な知見をもたらすものである。

研究成果の概要（英文）：Effects of spatiotemporal heterogeneity of oxygen concentration on mechanical properties of cancer cells and the surrounding extracellular matrix were investigated. A 3-in-1 chip which reproduces in vivo microenvironment was developed and employed to simultaneously control oxygen tension and mechanical and chemical stimuli to cells. Proliferation and migration speed of human breast cancer cell (MDA-MB-231 cell line) were increased under hypoxia than those under normoxia. However, these tendencies became unclear when the cancer cells were co-cultured with the vascular endothelial cells. Contraction and degradation of collagen gel was promoted under the co-culture condition, but its speed was slowed down by hypoxic exposure. Thus, it was found that changes of the cancer cell behaviors and the surrounding extracellular matrix as well as their interactions were oxygen-dependent.

研究分野：生体工学、流体工学

キーワード：マイクロ・ナノデバイス 細胞・組織 生物・生体工学 流体工学 ナノバイオ マイクロ流体デバイス  
がん微小環境 低酸素

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。

## 様式 F-19-2

### 1. 研究開始当初の背景

がんの転移は、がん細胞がその力学的特性を変化させることで原発腫瘍組織から単離することに始まる。がん細胞は血管やリンパ管内に侵入して移動した後、血管外に再度遊出して増殖し、2 次的な腫瘍組織を形成する。このような一連のプロセスにより、がんは転移する。がん細胞の遊走と増殖は、細胞群から分泌される生化学物質による細胞外マトリクスの変性と、細胞外マトリクス内の環境（密度、硬さ、孔の大きさ、間質流）に応じた細胞群の挙動の変化の相互作用により進行する。また、がん微小環境は細胞群の過剰な増殖により慢性的かつ不均一な低酸素状態にあるとともに、未成熟な血管網の形成に起因して一過性の低酸素負荷と再酸素化が生じる。このような時空間変化を有する低酸素環境は、がんの増殖や転移を促進するとされる。しかし、がん細胞の挙動の詳細とその背景にある細胞内のシグナル伝達、がん細胞と細胞外マトリクス間の相互作用に対し、時空間変化する酸素濃度が与える影響の詳細は不明であった。

### 2. 研究の目的

本国際共同研究課題の基課題である科学研究費補助金若手研究 (A) 「3-in-1 生体模擬チップによる細胞群の挙動制御」の研究では、細胞周囲の酸素分圧と細胞に対する力学的刺激および化学的刺激を厳密に制御して生体内微小環境を再現する「3-in-1 生体模擬チップ」を開発してきた。本国際共同研究では、がん細胞とその周囲の細胞外マトリクスの力学的特性（硬さ、粘弾性）の変化に焦点を当て、がん微小環境内の時空間変化する酸素濃度がそれらに対して与える影響を解明する。3-in-1 生体模擬チップを用いて、がん微小環境を構成する主な細胞であるがん細胞と血管内皮細胞の挙動と、周囲の細胞外マトリクスの力学的特性に対して酸素濃度が与える影響を細胞実験により明らかにする。さらに、その背景にあるシグナル伝達を解明して、細胞群の挙動を制御することを最終的な目標とした。

### 3. 研究の方法

本国際共同研究課題では、基課題で開発した細胞周囲の酸素分圧と細胞に対する力学的刺激および化学的刺激を厳密に制御して生体内微小環境を再現する 3-in-1 生体模擬チップを応用して細胞実験を行った。本チップを用いて、がん微小環境を構成する主な細胞であるがん細胞と血管内皮細胞の挙動と、周囲の細胞外マトリクスの力学的特性に対して酸素濃度が与える影響について調べた。本国際共同研究の遂行に際し、海外共同研究者であるマサチューセッツ工科大学の Roger D. Kamm 教授および Ming Guo 助教には、3-in-1 生体模擬チップを用いた細胞実験と、細胞および細胞外マトリクスの力学的特性の評価方法について助言を頂き、共同研究を実施した。

本研究では、ヒト乳がん細胞 (MDA-MB-231 細胞) を研究対象とし、密度と pH を変えることで硬さと孔のサイズを調整できるコラーゲンゲル内に混合し、3-in-1 生体模擬チップ内に 3 次元的に配置して培養した。チップ内のガス流路に酸素濃度を調整した混合ガスを供給することで酸素分圧を制御し、がん細胞に酸素濃度の時間変化や空間変化を与えてタイムラプス観察を行った。得られた時系列の顕微鏡画像を解析することにより、がん細胞の形態や遊走を定量評価した。また、酸素濃度によるがん細胞の挙動や力学的特性の変化の機序に関して、実験後のチップ内の細胞を固定して行う免疫蛍光染色や、細胞を回収して行うウェスタンブロッティングなどにより、その背景にあるシグナル伝達について調べた。さらに、海外共同研究者が有する光ピンセット技術を用い、がん細胞と細胞外マトリクスの力学的特性（硬さ、粘弾性）を計測することについても検討した。ここでは、細胞と細胞外マトリクスに直径数百 nm のビーズを含有させ、海外共同研究者が有する光ピンセット技術を用いてビーズを操作することで、3 次元微小環境におけるがん細胞と細胞外マトリクスの力学的特性を計測した。ここで、チップ内でがん微小環境をよりに忠実に再現するために、メディア流路に血管内皮細胞を播種し、がん細胞と血管内皮細胞の共存培養下における各細胞の挙動や、生体外マトリクスの変化についても計測した。一連の実験により、酸素濃度によるがん細胞と細胞外マトリクスの力学的特性の変化と、それらの相互作用について考察した。

### 4. 研究成果

平成 30 年度内の通算 6 ヶ月、マサチューセッツ工科大学機械工学科の客員研究員として、海外共同研究者である Roger D. Kamm 教授の研究室に滞在して共同研究を実施した。

共同研究においては、まず、本国際共同研究課題の基課題の目的でもあった、細胞周囲の酸素分圧と細胞に対する力学的刺激および化学的刺激を厳密に制御して生体内微小環境を再現する 3-in-1 生体模擬チップを完成させた (図 1)。本チップはポリジメチルシロキサン (PDMS, Sylgard 184 Silicone

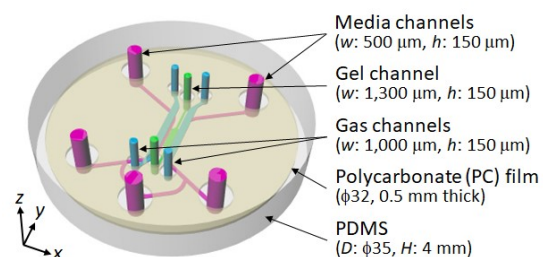


図 1 3-in-1 生体模擬チップの概観図。

Elastomer Kit, Dow Corning, USA) を用いて作製した。チップ内には、細胞外マトリクスを模擬してハイドロゲルを配置するゲル流路 (幅 1,300  $\mu\text{m}$ ) が底面の中央にあり、それを挟むように細胞培養液で満たすメディア流路 (幅 500  $\mu\text{m}$ ) が存在する。チップ内部の酸素濃度はメディア流路の鉛直上方 500  $\mu\text{m}$  の位置にあるガス流路 (幅 1,000  $\mu\text{m}$ ) に酸素濃度を調整した混合ガスを供給することにより制御する。細胞培養を行うためのゲル流路およびメディア流路と混合ガスを供給するガス流路の間は PDMS で仕切られており、細胞培養液と混合ガスは直接接しておらず、PDMS を介したガスの交換により酸素濃度が制御される。ここで、チップ内には周囲環境からの酸素の拡散による流入の影響を防ぐ目的で、高さ 1 mm の位置にガス透過性の低いポリカーボネートフィルム (直径 32 mm、厚さ 0.5 mm) を内包させた。デバイスは直径 35 mm、厚さ 4 mm、いずれの流路の高さも 150  $\mu\text{m}$  である。

開発した 3-in-1 生体模擬チップ内にヒト乳がん細胞 (MDA-MB-231/GFP cell line, AKR-201, Cell Biolabs, USA) をコラーゲンゲルに混ぜて配置し、ガス流路に混合ガスを供給することで酸素濃度の時間変化や空間変化を与えた際の挙動をタイムラプス観察した。ここでは、酸素濃度 0.3% から 21% までの様々な酸素濃度の様な酸素状態や、傾きの異なる酸素濃度勾配を生成した。また、混合ガス中の酸素濃度を定期的に変化させることで酸素濃度の時間変化を与えた場合の観察も行った。各酸素条件における MDA-MB-231 細胞の時系列の顕微鏡画像を解析して各細胞の遊走距離を計測することで、MDA-MB-231 細胞の遊走が酸素濃度に依存することを明らかにした。酸素濃度のレベルをより細かく分割して実験を行った結果、MDA-MB-231 細胞の遊走速度は低酸素環境下で常酸素環境下と比べて増加し、酸素濃度 5% において極大値を示した。また、酸素濃度の空間変化を生成した酸素濃度勾配下においては、低酸素領域における MDA-MB-231 細胞が中等度の低酸素領域に移動する傾向を示した。さらに、ガス流路に供給する混合ガス中の酸素濃度を 8 時間毎に 0% から 21% に交互に切り替えることで酸素濃度の時間変化を与えた場合は、MDA-MB-231 細胞が周囲の酸素濃度の変化を感知して遊走を変化させるまでに数時間以上を要することが示唆された。

海外共同研究者の研究室に滞在中、先方が有する光ピンセット技術を用いてがん細胞や細胞外マトリクスの力学的特性を計測することについても検討した。直径数百 nm のビーズを懸濁させた細胞培養液を MDA-MB-231 細胞を培養しているディッシュに注入し、一晚培養することで細胞のエンドサイトーシスの作用により細胞内にビーズを取り込ませた。その MDA-MB-231 細胞をコラーゲンゲルに混合し、開発した 3-in-1 生体模擬チップ内のゲル流路に配置した。光ピンセット装置を用いて顕微鏡観察下でビーズを操作することで、3-in-1 生体模擬チップ内の MDA-MB-231 細胞の粘弾性特性を計測することができた。しかし、酸素濃度を変化させながら計測を行うためには、光ピンセット装置のステージ上で培養を行いながら混合ガスを供給する必要があった。そのための実験装置の組み換えなどを行うことが現実的に困難であったことから、実際に計測するには至らなかった。今後、光ピンセット装置を導入し、本研究に特化した構成にカスタマイズすることで、MDA-MB-231 細胞の粘弾性特性の酸素濃度依存性を明示できる可能性については確認することができた。

がん細胞とその周囲の細胞外マトリクスの力学的特性に対して酸素濃度が与える影響を解明するためには、生体外でがん微小環境を再現することが重要である。そこで、MDA-MB-231 細胞をコラーゲンゲルに混ぜて培養するゲル流路に隣接するメディア流路上にヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC, C2519A, Lonza, Switzerland) を播種し、MDA-MB-231 細胞と血管内皮細胞を共存培養する検討と、その時の各細胞の挙動と細胞外マトリクスの変化について調べた。ここでは、2 層構造を有する 3-in-1 生体模擬チップの他に、作製がより簡単な単層式の酸素濃度制御マイクロ流体デバイスを用いた。3-in-1 生体模擬チップとの違いは、ガス流路が PDMS のパーティションを隔ててメディア流路の横に隣接するように設けられており、酸素濃度 1% まで低酸素状態の生成は限定されることである。ガス流路に酸素濃度を調整した混合ガスを供給して酸素濃度を常酸素状態または低酸素状態に制御し、MDA-MB-231 細胞および HUVEC の挙動をタイムラプス観察した。単一培養時の MDA-MB-231 細胞は、低酸素下において増殖率や遊走速度が増加したが、HUVEC との共存培養下ではそのような MDA-MB-231 細胞の酸素依存の挙動が不明瞭になった。長期間の共存培養も行い、各細胞の挙動と生体外マトリクスを模擬するために用いたコラーゲンゲルの変化を観察した。時間の経過に伴ってコラーゲンゲルは退縮し、2 日目以降には MDA-MB-231 細胞のコラーゲンゲル外への遊出も見られた。このコラーゲンゲルの退縮は各細胞の単一培養下よりも共存培養下において促進された。さらに、細胞培養を 2 日以上行った場合に観察されたコラーゲンゲルの退縮に対する酸素濃度の影響について調べた。MDA-MB-231 細胞と HUVEC のいずれも培養日数が進むにつれて増殖し、実験を開始して 2 日目以降にはがん細胞のコラーゲンゲル外への遊出が見られた。いずれの酸素条件下においてもコラーゲンゲルが退縮したが、低酸素下では常酸素下よりも退縮の速度は遅くなった (図 2)。

MDA-MB-231 細胞と HUVEC を共存培養した際に、培養条件 (単一培養または共存培養) と酸素条件に依存したコラーゲンゲルの退縮が観察されたことから、その変化のメカニズムについてより詳細な検討を行った。特に、HUVEC によるコラーゲンゲルの分解がより大きな影響を与えていることが示唆されたことから、マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) に着目し、生体外マトリクス中の MMP の産生量を細胞および生体外マトリクスの免疫蛍光染色やウェスタンブロッティングなどにより調べた。その結果、低酸素下では MMP-7 の産生量が減少しており、細胞外マトリクスの力学的特性の変化に寄与していることが明らかになった。

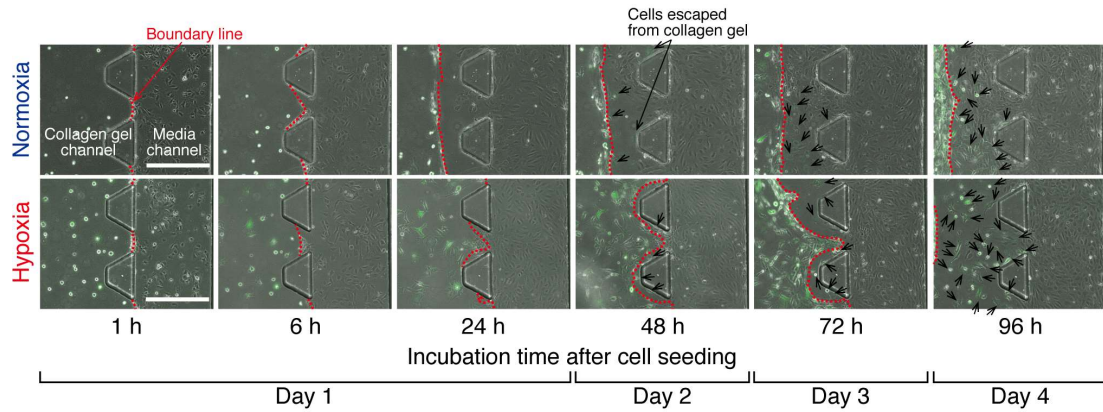


図 2 常酸素状態（酸素濃度 21%）および低酸素状態（酸素濃度 1%）におけるがん細胞と血管内皮細胞の共存培養の 4 日間のタイムラプス観察結果. 緑色の蛍光を発している細胞がヒト乳がん細胞の MDA-MB-231 細胞であり、そうでない細胞はヒト臍帯静脈内皮細胞である. 図中の赤い点線はコラーゲンゲルと細胞培養液の境界を表し、黒色の矢印はコラーゲンゲルから遊出した MDA-MB-231 細胞を示している. スケールバーは 400  $\mu\text{m}$  を表す.

本研究における細胞実験結果から、生体外マトリクスを模擬するためにコラーゲンゲルを用いた場合は、コラーゲンゲルの収縮や分解が生じて退縮したことから、数日間以上の長期間にわたってがん細胞や血管内皮細胞の挙動や相互作用を観察することが困難であった。コラーゲンゲルの代わりにフィブリンゲルを用いることについても検討を行った結果、フィブリンゲル内でも細胞の遊走は観察でき、顕著な退縮が生じないことから、長期間の細胞実験に適していることを確認した。さらに、海外共同研究の研究室への研究滞在中には、当該研究独自の細胞培養技術であるハイドロゲル内に微小血管網を構築する方法を習得した。これにより 3-in-1 生体模擬チップ内で微小血管網を構築することが可能になり、がん微小環境をより忠実に再現できるようになるとともに、開発したチップを応用した新たな研究への展開も見られた。

#### <引用文献>

- ① Rei Koens, Yugo Tabata, Jean C. Serrano, Satoshi Aratake, Daisuke Yoshino, Roger D. Kamm, Kenichi Funamoto, Microfluidic platform for three-dimensional cell culture under spatiotemporal heterogeneity of oxygen tension, *APL Bioengineering*, Vol. 4, Issue 1, 2020, 016106-1-11.
- ② Daisuke Yoshino, Kenichi Funamoto, Oxygen-dependent contraction and degradation of the extracellular matrix mediated by interaction between tumor and endothelial cells, *AIP Advances*, Vol. 9, Issue 4, 2019, pp.045215-1-10.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yoshino Daisuke, Funamoto Kenichi	4. 巻 9
2. 論文標題 Oxygen-dependent contraction and degradation of the extracellular matrix mediated by interaction between tumor and endothelial cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 AIP Advances	6. 最初と最後の頁 045215 ~ 045215
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1063/1.5089772	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Koens Rei, Tabata Yugo, Serrano Jean C., Aratake Satoshi, Yoshino Daisuke, Kamm Roger D., Funamoto Kenichi	4. 巻 4
2. 論文標題 Microfluidic platform for three-dimensional cell culture under spatiotemporal heterogeneity of oxygen tension	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 APL Bioengineering	6. 最初と最後の頁 016106 ~ 016106
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1063/1.5127069	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 船本健一	4. 巻 52
2. 論文標題 生体内低酸素微小環境を再現するマイクロ流体デバイス	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 月刊「細胞」	6. 最初と最後の頁 50 ~ 53
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 1件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 船本健一
2. 発表標題 地球の裏側で
3. 学会等名 日本機械学会第29回バイオフィロントニア講演会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 コーエンズ礼、田端優吾、吉野大輔、Roger D. Kamm、船本健一
2. 発表標題 乳腺がん細胞の遊走と増殖の酸素依存性
3. 学会等名 日本機械学会第29回バイオフィロンティア講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田端優吾、吉野大輔、船本聖絵、コーエンズ礼、船本健一
2. 発表標題 マイクロ流体デバイスを用いた酸素制御下の血管内皮細胞単層の遊走の評価
3. 学会等名 日本機械学会第29回バイオフィロンティア講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Rei Koens、Yugo Tabata、Daisuke Yoshino、Kenichi Funamoto
2. 発表標題 Breast cancer cell migration under controlled oxygen tensions
3. 学会等名 The 15th International Conference on Flow Dynamics (ICFD2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yugo Tabata、Daisuke Yoshino、Kiyoe Funamoto、Rei Koens、Kenichi Funamoto
2. 発表標題 Influence of hypoxic environment on vascular endothelial cell migration
3. 学会等名 The 15th International Conference on Flow Dynamics (ICFD2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 船本健一、吉野大輔
2. 発表標題 がん微小環境チップによる酸素濃度制御下の細胞外マトリクスの変化の観察
3. 学会等名 日本機械学会第31回バイオエンジニアリング講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kenichi Funamoto, Rei Koens, Yugo Tabata, Daisuke Yoshino
2. 発表標題 Oxygen-dependent migration of breast cancer cell is altered by cell-cell interaction with vascular endothelial cells
3. 学会等名 The 17th International Conference on Biomedical Engineering (ICBME 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 船本健一、コーエンズ礼、田端優吾、吉野大輔
2. 発表標題 酸素濃度勾配下における乳がん細胞の遊走
3. 学会等名 日本機械学会第32回バイオエンジニアリング講演会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	カム ロジャー  (Kamm Roger)	マサチューセッツ工科大学・機械工学科・教授	

## 6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
その他の 研究協 力者	グオ ミン  (Guo Ming)	マサチューセッツ工科大学・機械工学科・助教	