

令和 元年 9 月 3 日現在

機関番号：17401

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：2017～2018

課題番号：16KK0148

研究課題名（和文）転移抑制・制御に向けたがん細胞4次元浸潤力学場のin situ計測システムの開発（国際共同研究強化）

研究課題名（英文）Development of in-situ measurement system for 4D dynamics of tumor invasion toward metastasis suppression/control(Fostering Joint International Research)

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） 10,700,000円

渡航期間： 12ヶ月

研究成果の概要（和文）：がん組織のモデルであるがんスフェロイドは、周囲の細胞外マトリックスに、はじめは膨張場と収縮場が混在する不安定な場を形成するが、時間とともに収縮場のみを形成する。しかしその収縮の強度は場所により異なる。がんスフェロイドからの浸潤の起点は、その収縮強度の高い場所から発生するが、それだけでは浸潤を開始しない。その収縮力により、細胞外マトリックスを形成するコラーゲン線維束が効率的に集まった場所からでしか、浸潤は成長しないことを明らかにした。このように、本申請課題で開発した計測技術により、4Dでがん細胞の浸潤機序を明らかにすることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本国際共同研究によって、がんスフェロイド周辺の詳細な浸潤力学場の観察に成功した。その力学場は、単一がん細胞が三次元コラーゲル中に存在するときと定性的に同じ収縮場であったが、その不均一性が顕著であった。この収縮場の不均一性とコラーゲン線維の構造変化が、浸潤の起点となり得るという、機構解明に向け興味深い結果を示せたと考えている。本申請課題で得られた結果は、がん浸潤の力学的要因の一端を明らかにし、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）：Cancer spheroids as a model of cancerous tissues produced contraction force field to the ECM (Extracellular matrix) around the spheroid with time although the force field was heterogeneous force field between expansions and contractions at the beginning. Invasion of the cancer cells from the spheroids initiated at the locations with high contraction, but it wasn't a sufficient condition. It has been found that the invasion of the cancer cells from the spheroids grows well if the collagen fibers constituted the ECM are collected at the edges of the spheroid by the high contraction force. Consequently, the project has succeeded to elucidate the one of the mechanisms for 4D cancerous invasion.

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 スフェロイド 細胞外マトリックス

様式 F - 19 - 2

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に飛び出し遊走する、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) その観点から、浸潤の起点となるがん組織(がん細胞集団)と周囲の細胞外マトリックスの力学的相互作用も非常に重要である。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、がん組織のモデルとしてがんスフェロイドに着目する。

(2) がんスフェロイドが細胞外マトリックスに形成する力学場を定量的に測定する計測技術を確立する。

(3) がんスフェロイドと細胞外マトリックスを構成するコラーゲン線維との力学的相互作用について検討し、がんスフェロイドからの浸潤、そのスフェロイドが細胞外マトリックスに形成する力学場、および細胞外マトリックスの構造の関係性について明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 細胞には、ヒト膵臓腺がん細胞(PANC-1)を用いた。このがん細胞は、事前の遺伝子操作により自家蛍光を示す。

(2) 専用の96well-plateを用いてがんスフェロイドを作製した。作製時の細胞数は、300個/wellである。

(3) 三次元培養状態を実現するため、作製したがんスフェロイドをコラーゲンゲルに包埋した。そのとき、力学場観察を行う試験片には直径500nmの蛍光ビーズを分散させ、コラーゲン線維の構造観察を行う試験片ではコラーゲン線維に免疫蛍光染色処理を施した。

(4) 評価には、がんスフェロイドの形状、がんスフェロイドが形成する細胞外マトリックスの力学場、そしてがんスフェロイド周辺の細胞外マトリックスを構成しているコラーゲン線維束の構造を用いた。

(5) がんスフェロイドの三次元形状評価には、共焦点レーザー顕微鏡で自家蛍光するがんスフェロイドを記録し、形状を抜き取った。

(6) がんスフェロイドの力学場評価には、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、三次元ボリュウム相関(Digital Volume Correlation)法で変形場を算出した。

(7) コラーゲン線維の構造評価には、共焦点レーザー顕微鏡でコラーゲン線維の画像を取得し、二値化等の画像処理から、コラーゲン線維の濃度を定量評価した。

4. 研究成果

(1) 本研究課題で開発・改良した力学場可視化技術を用い、がん組織のモデルとするがんスフェロイドが形成する力学場の定量的計測に成功した。

(2) がんスフェロイドが周囲の細胞外マトリックスに形成する力学場は、はじめは膨張・収縮場が混在する不均一場であったが、時間の経過とともに収縮場に収束していった。すなわち、がんスフェロイドが周囲の細胞外マトリックスを引張る形式の力学場であった。しかしながら、その収縮力は、がんスフェロイドがほぼ球体であるにもかかわらず、場所によって異なる不均一性を有していた。

(3) その収縮力は、がんスフェロイドから浸潤が伸長する場所で高い値を示した。

(4) 一方、がんスフェロイド周辺の細胞外マトリックスの構造観察にも成功し、がんスフェロイドから伸長する浸潤領域の局所的構造変化を細胞外マトリックスを構成しているコラーゲン線

維束の濃度変化という形で定量的に評価することに成功した。

(5) そのため、がんスフェロイドから浸潤が伸長するとき、細胞外マトリックスに形成される力学場と構造変化に関する関係について明らかにすることに成功した。

(6) すなわち、がんスフェロイドから浸潤が伸長する際、その浸潤先端領域では、その周辺より高い値を有する収縮場(細胞外マトリックスであるコラーゲン線維束を引張る力)が形成される。

(7) その力に応じて、コラーゲン線維が浸潤先端領域に顕著に集まる場合(コラーゲン線維濃度が高くなる場合)、浸潤はさらに伸長していった。

(8) その力に応じて、コラーゲン線維が浸潤先端領域に顕著に集まらないが、構造に変化がない場合(コラーゲン線維濃度に変化がない場合)、浸潤の伸長が鈍化した。

(9) 他方、その力に対しても、コラーゲン線維が浸潤先端に収束せず、線維構造が消失する場合(コラーゲン線維濃度は減少する場合)、浸潤は完全に停止された。

(10) この結果は、がんスフェロイドのがん細胞が、細胞外マトリックスに力(引張る力)を及ぼし、それを構成するコラーゲン線維の構造再編を促していることを示している。そして、浸潤先端でコラーゲン線維が足場としてち密な構造をとる場合、浸潤を活発的に成長させていることを示している。

(11) すなわち、がん組織の周辺にある細胞外マトリックスの構造変化を能動的に促すことができれば、その浸潤を抑制・制御できる可能性を示唆しており、この成果は、新しい創薬開発の一助となる可能性を秘めている。

5. 主な発表論文等 (研究代表者は下線)

[雑誌論文](計 4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, Fe₃O₄@mSiO₂, 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. S15, No.3, pp.1-11, 2018.

https://jmeche.uitm.edu.my/wp-content/uploads/bsk-pdf-manager/1_S1_5_1_ID_081_344.pdf

[学会発表](計 8件)

森田康之, 山内崇司, 徳悠葵, 巨陽, “がん転移における浸潤起点と周辺細胞外基質の変形特性に関する研究,” 日本実験力学学会 The 18th Conference on Biomechanics in Niigata, 2019.

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.

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 回バイオフィロンティア講演会, 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.

6 . 研究組織

研究協力者

〔主たる渡航先の主たる海外共同研究者〕

研究協力者氏名：コーリー ニュー

ローマ字氏名：Corey Neu

所属研究機関名：コロラド大学ボルダー校

部局名：機械工学科

職名：准教授

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。