

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K01375

研究課題名(和文) 3次元共培養モデルを用いたガン細胞血管浸潤の実時間観察とガン転移の生体力学的検討

研究課題名(英文) Three Dimensional and co-culture model for Vascular metastasis of cancer

研究代表者

片岡 則之 (Kataoka, Noriyuki)

日本大学・工学部・教授

研究者番号：20250681

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ガン転移の詳細なメカニズム解明のため、すなわちガン細胞が血管組織に接着、浸潤する様子を直接観察可能な血管等の3次元培養モデルを用いてガン細胞の挙動を観察した。本研究の結果、明確に浸潤挙動が確認出来た。流れ負荷条件下では、動脈系の流速ではガン細胞の血管内皮への接着は非常に難しく、静脈系、あるいは微小循環系で想定されるせん断応力、流速でガン細胞の内皮細胞への接着、浸潤が生じやすい、と考えられる結果であった。骨組織を模擬した3次元共培養系では、石灰化が生じた実験条件下のみ、ガン細胞の浸潤が確認された。

本研究により、ガンの転移を直接、観察する実験系の構築に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在のガン治療においては、早期診断・早期治療とともに、ガンの再発・転移の予防が重要な課題である。これまでの多くの研究により、分子レベルのガン細胞転移プロセスの解明は進んできた。ところが、各因子の相互的な作用、現象の連続的な解明は行われておらず、全容解明には程遠い状態である。このようななか、生化学的な研究と動物実験の相補的な役割を果たすが、本研究で目指している「3次元共培養モデル」である。本研究のモデルを用いれば、分子、タンパク、細胞の挙動を実時間かつ3次元的にイメージングすることが可能であり、ガン細胞転移プロセスの解明の大きなブレイクスルーとなりうる。

研究成果の概要(英文)：Melanoma cells have metastasis-ability, invasive-ability, and migrate-ability. It is said that S100 protein triggers invasion of melanoma cells. In order to prevent metastasis of melanoma cells, it is important to know the migrate-ability of melanoma cells. Therefore, we constructed 3-dimensional culture model. In this study, in order to compare the influence on melanoma cells by using HEK 293, we made three conditions of models. And we analyzed the obtained data, behavior of melanoma cells were analyzed from two axes of X, Y and Z axes. We have successfully observe the cancer cell behavior on 3-dimensional culture model. Moreover, we have observed the cancer cell behavior on endothelial cells with fluid shear stress application. Under the aortic level of shear stress, cancer cell trans-endothelial migration were not observed.

研究分野：生体工学

キーワード：ガン転移 バイオメカニクス 3次元共培養

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

現在、わが国における死因の第1位は悪性新生物、「ガン」である。昨今、ガンの早期診断、早期治療が格段に進んでいるが、患者数は一貫して増加しており、平成26年の全死者に占める割合は30%で、全死者のおよそ3.5人に1人は悪性新生物で死亡している(厚生労働省 平成26年 人口動態統計月報年計)。ガンの早期診断が進んでいる状況ではあるが、ガンが見つかった多くの患者で、すでに転移が生じていると考えられている。例えば、肺ガン患者においては、80%以上の患者にガンの転移が生じているとの報告もある(Howlander, N. et al. SEER cancer statistics review 1975-2008. National Cancer Institute)。

ガン細胞は原発巣で増殖し、組織の成長に必要な血管新生を伴いつつ成長する。ガン組織の成長には増殖因子とその受容体がオートクラインまたはパラクライン的に関与していると考えられており、また、血管新生にはVEGF(Vascular Endothelial Growth Factor)をはじめとした血管内皮細胞に対する増殖因子が大きく関与している。現在、血管新生はガン原発巣での治療ターゲットの1つとして注目されている。その後、ガン原発巣ではE-cadherinをはじめとした細胞間の接着タンパクの発現低下、細胞外マトリックスの分解酵素であるMMP(Matrix metalloproteinase)の産生、活性酸素種の産生が生じて血管に離脱していく。血管に移動したガン細胞は、全身性に循環し、その多くは免疫系の働きや血流自体の物理的作用によって死滅するが、一部は内皮細胞とゆるい接着を起こす。この際に関与している分子はガン細胞表面の糖鎖と内皮細胞表面に発現するE-セレクチン、P-セレクチンである。さらに、ガン細胞表面のLFA-1やVLA-4などのインテグリンと血管内皮細胞のICAM-1やVCAM-1などの接着分子と、より強固な結合を起こし、内皮下に浸潤、増殖を起こし、転移巣の形成へとつながっていく。

上述のように、ガン細胞の血管を介した転移の分子機構は、各ステップで明らかになりつつある。ここで興味深いのは、ガン細胞の内皮細胞への接着・浸潤に関与する分子群が、炎症が生じた血管での好中球の接着・浸潤、あるいはアテローム性動脈硬化発症初期に、単球が血管内膜に接着・浸潤する際に関与している分子群と共通しているということである。また、細胞動態も非常に似通っている。これまで我々は、アテローム性動脈硬化発症初期の細胞挙動、関与する分子メカニズムに焦点をあてて研究してきた。アテローム性動脈硬化症の発症初期には、血管内皮下に蓄積した酸化脂質を食食するために白血球の1つである単球が浸潤する。複雑な局所血流やサイトカイン等の刺激によって内皮細胞が活性化された部位に、VCAM、ICAM、Selectin等の接着タンパクの発現増加が起こり、これらを介して血流中の単球が内皮細胞上に接着し、その後、内皮下に浸潤していく(Glass CK, Witztum JL., Cell, 2001)。

我々は、共焦点レーザー顕微鏡を用いた独自の実験系により個々の単球の3次元浸潤ダイナミクスを高精細蛍光像としてイメージングする系を確立し(Atherosclerosis, 2004,2007)、動脈硬化発症因子である酸化LDLが内皮細胞間隙分子の発現制御(PECAM-1の増加, VE-cadherinの抑制)により単球浸潤を促進することを報告した(Int J Cardiol, 2011)。これら動脈硬化発生のプロセスとガンの血管浸潤プロセスがほぼ同じであると考えられているが、ガンの血管浸潤・転移のメカニズムは、その動態を直接捉えることが出来ず、未だに未解明なことが多い。一方、連携研究者の阪口は、Ca結合タンパク質であるS100タンパク質の一種であるS100A8、S100A9が細胞増殖制御異常や悪性黒色腫(メラノーマ)の転移能亢進に密接に関与する可能性を見出した(Cancer Res 2013)。

## 2. 研究の目的

本研究では、まずはガン細胞の血管への接着・浸潤、また転移の動態を3次元的に観察するた

めの「3次元共培養モデル」の構築を行う。3次元共培養モデルをフローチャンバーに設置して、様々な流動条件下でガン細胞の血管への浸潤に及ぼす血流因子の影響を検討する。

### 3. 研究の方法

3次元共培養モデルの構築を目指す。細胞は、ヒト臍帯静脈由来内皮細胞（以下 HUVEC）、ヒト悪性黒色腫（メラノーマ）由来株化細胞の MeWo、そして後述する HEK293 A8/A9 細胞を使用する。メラノーマ細胞は、非常に転移性、遊走性の高いガン細胞の一種である。

培養ディッシュ上に厚さ 20  $\mu\text{m}$  程度のコラーゲンゲルの層を作り、その上に HUVEC 培養した。コラーゲンゲル層作成の際、HEK293 A8/A9 細胞を包埋した。予備実験として行っている、メラノーマ細胞、Mewo の HUVEC 上の遊走観察では、MeWo の単位時間当たりの遊走距離は単球の 1/10 以下で、白血球と比べると非常にゆっくりとした動きであった。よって、連携研究者の阪口（岡山大学医歯薬学総合研究科細胞生物学教室 教授）らの見出した、メラノーマ細胞の転移能亢進物質である S100 A8/A9 を使用した。阪口らは、S100 A8/A9 産生遺伝子を導入した HEK293 細胞株（ヒト胚性腎臓細胞由来株化細胞）を樹立しており、これをコラーゲンゲル層に包埋することによって、より病態に近いモデルの構築を目指した。フローチャンバーは、一定流量の層流を内皮細胞に負荷するものと、流路幅が急激に変化し、平面的 2 次流れを HUVEC に負荷するものを作製した。

一方、3次元共培養モデルをガンの骨転移解析にも適用した。in vitro での 3次元モデルを作製するために、骨芽細胞様株化細胞 MC3T3-E1 を長期間培養して石灰化させ、石灰化基質の作製を試みた。そこへメラノーマ細胞を播種し、ガンの骨転移モデルの実験を行った。

### 4. 研究成果

3次元培養モデルを3つの条件で作製を行った。各条件を図1、図2、図3に示す。条件は以下とした。

条件1: Huvec のみ

条件2: Huvec+コラーゲンゲル

条件3: Huvec+コラーゲンゲル+HEK293A8/A9

この3つの条件すべてに炎症性サイトカイン(IL-1 $\beta$ )を 2 $\mu\text{L}$ (濃度 10mM)添加し、4時間インキュベーター内に静置したのち、フラスコに培養していたガン細胞を 100 $\mu\text{L}$  添加し、1時間後に観察を開始した。ガン細胞の遊走実験には、簡易インキュベーター(温度 37 $^{\circ}\text{C}$ 、湿度 100%、CO<sub>2</sub>濃度 5%)と倒立型顕微鏡(20倍対物レンズ)を使用した。画像読み込みソフトには、マイクロマネージャーを使用し、CCDカメラ(Andor)で2分間隔に1枚、計1時間連続撮影を行った。

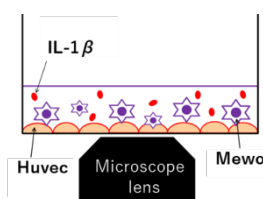


図1 Huvec のみ

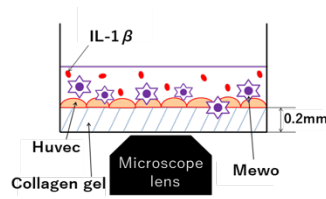


図2 Huvec+コラーゲンゲル

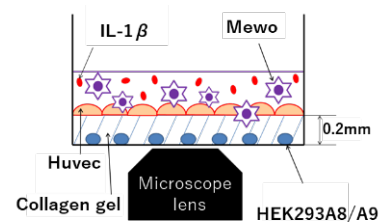


図3 Huvec+コラーゲンゲル  
+HEK293A8/A9

図4に実験装置の概略図を示す。3次元培養モデルの作製後、炎症性サイトカインを 2 $\mu\text{L}$  添加し、インキュベーター内に4時間静置した。その後、クリーンベンチ内で3次元培養モデル

内の培養液を廃液し、フローチャンバーを固定した。ガン細胞が混濁した培養液を 50mL シリンジに入れ、シリンジポンプで流れを負荷した。流路の寸法は幅 18mm、長さ 23mm、厚み 0.5mm とした。実験条件として、せん断応力を 0.01 から 0.02Pa、培養液温度 37°C、実験時間 1h とした。

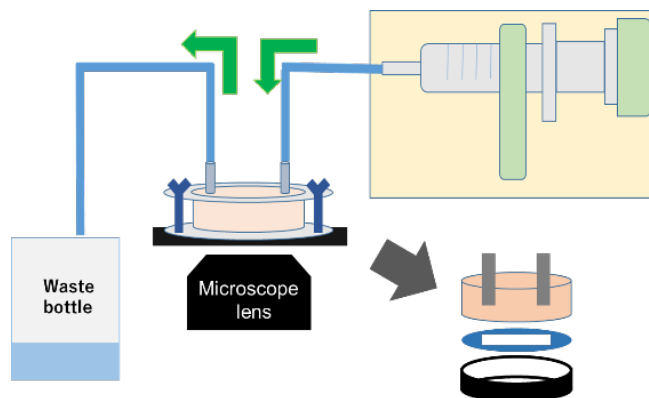


図 5 流れ負荷実験の実験回路

表 1 に静置培養下でのガン細胞の遊走結果を示す。表 1 より、最もガン細胞の移動距離が大きかったのは、Huvec のみの条件であり、最も移動距離が小さかったのは、HEK293A8/A9 包埋モデルであった。また、平均速度も Huvec のみの条件が最も速く、HEK293A8/A9 包埋モデルでは最も遅い結果となった。このことから、Huvec のみの場合ではメラノーマ細胞が接着せずに遊走していたと考えられる。ゲル上に Huvec 培養したモデルでは、ゲルによって細胞接着性が増したと考えられる。HEK293A8/A9 包埋モデルでは、図 5、図 6 に示すように、ガン細胞の浸潤現象が確認されたことから、HEK293 が放出する S100A8/A9 によってガン細胞の浸潤能が増加し、接着するだけでなく、浸潤を促進していることが確認出来た。

表 1 各実験条件下でのメラノーマ細胞の移動距離と遊走速度

Conditions	Moving distance ( $\mu\text{m}$ )	Average speed ( $\mu\text{m}/\text{min}$ )
Condition 1	84.88	1.41
Condition 2	64.89	1.08
Condition 3	59.19	0.99

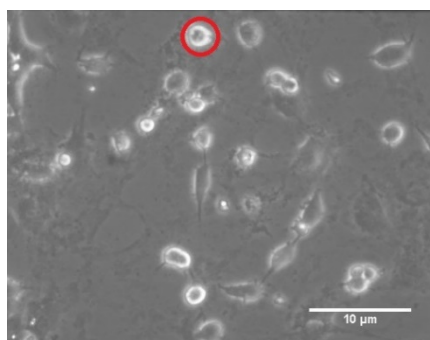


図 5 ガン細胞浸潤前

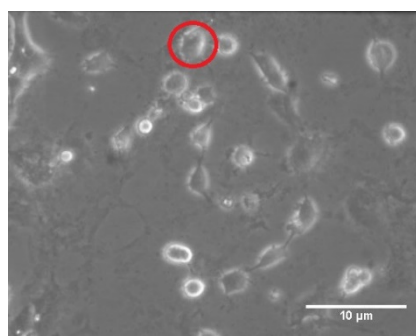


図 6 ガン細胞浸潤後

流れ負荷時のメラノーマ細胞の挙動であるが、ゲル表面および HUVEC 表面近傍を流れているメラノーマ細胞をランダムに 5 つ選択し、細胞速度を解析した結果、 $2.3 \pm 0.5 \mu\text{m}/\text{s}$ 、 $2.5 \pm 0.5 \mu\text{m}/\text{s}$ 、 $2.5 \pm 0.4 \mu\text{m}/\text{s}$ 、 $1.6 \pm 0.3 \mu\text{m}/\text{s}$ 、 $1.6 \pm 0.5 \mu\text{m}/\text{s}$  となった。

一部の細胞はゲル表面や HUVEC 表面に緩く結合しながら、その表面近傍をローリング

しながら流れているのが確認された。この現象は、ガン細胞の組織への浸潤プロセスの一過程といえる。ローリングによって減速したメラノーマ細胞は、時間経過に伴って接着部位に留まり、強い結合によって接着した。その後、メラノーマ細胞が消えていくことから、HEK293A8/A9 細胞が産生する S100A8/A9 タンパクによって Z 軸方向への浸潤が促されたと考えられる。

本実験では、初期条件がせん断応力 0.005Pa、平均流速 970 $\mu\text{m/s}$  の場合、メラノーマ細胞が非常に短時間で観察視野を通過してしまった。また、HUVEC との細胞接着が確認されなかった。本実験の実験条件としたせん断応力 0.002Pa、平均流量 400 $\mu\text{m/s}$  で流れを负荷した場合、メラノーマ細胞の観察および HUVEC との細胞接着を確認することができた。したがって、細胞培養系の流れ负荷実験では、流れの速度による影響によってメラノーマ細胞の細胞接着度合いに変化があると考えられる。すなわち、動脈系の流速では、ガン細胞の血管内皮への接着は非常に難しく、静脈系、あるいは微小循環系で想定されるせん断応力、流速でガン細胞の内皮細胞への接着、浸潤が生じやすい、と言える。

一方、図 7 に示す、骨組織を模擬した 3 次元共培養系では、骨芽様株化細胞 MC3T3 が分化、石灰化を起こした時にのみ、ガン細胞の浸潤が観察された。ガン細胞の接着から浸潤までの総移動距離は、165  $\mu\text{m}$ 、1 分間の平均移動距離が 2.08  $\mu\text{m}$  であった。ガン細胞を CellTracker Green 染色し、3 次元位置を確認すると、図 8 に示すように、骨芽細胞下に浸潤した状態が確認出来た。

ガン細胞は浸潤過程で細胞外基質を分解する際に、細胞膜から膜突起を伸ばし、タンパク分解酵素 (MMP) を分泌して細胞外基質の分解をしている。それにはカルシウムイオンが必要となる。よって、そのカルシウムイオンが石灰化部分から放出され、ガン細胞の MMP の活性化に繋がったのではないかと推測している。

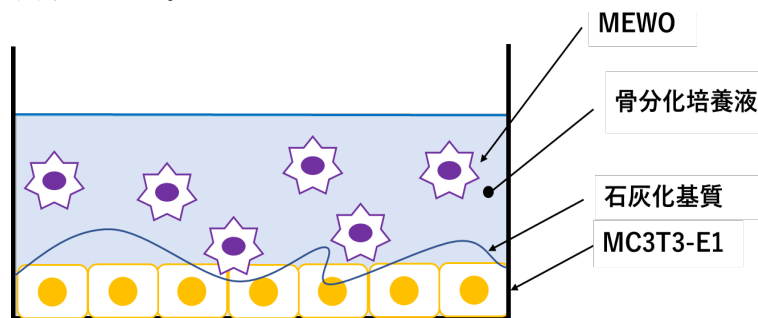


図 7 骨芽細胞をもとにした 3 次元培養実験系

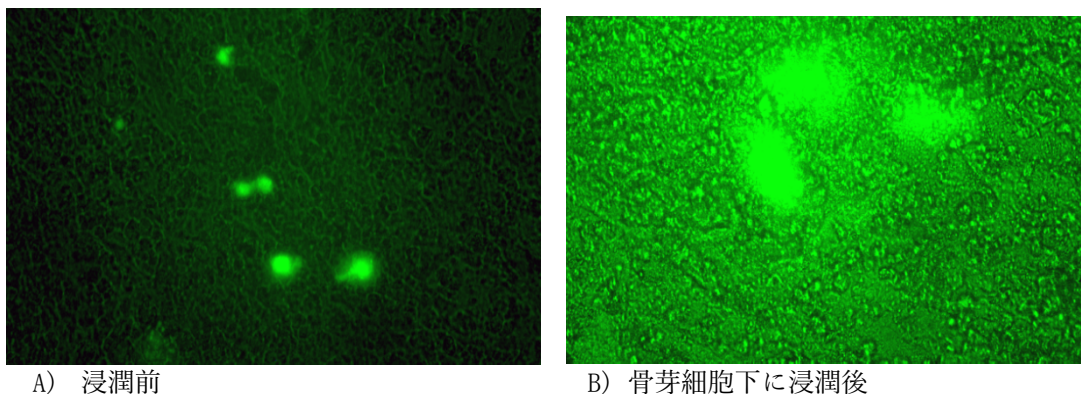


図 8 CellTracker Green 染色したメラノーマ細胞の挙動

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Tomoteru Oka, Gan Buntara Sthenly and Noriyuki Kataoka1
2. 発表標題 Real-time observation of F-actin fluctuation in living cell
3. 学会等名 World Congress on Biomechanics 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 斎藤雅史、菅野健太、霜田浩貴、竹下彪我、堤浩平、片岡則之
2. 発表標題 3 次元培養モデルを用いた流れ場でのメラノーマ細胞の実時間観察
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 岡 知輝, 片岡則之
2. 発表標題 生細胞内アクチンフィラメントの微小ゆらぎの計測
3. 学会等名 第56回日本生体医工学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 岡 知輝, 片岡則之
2. 発表標題 生細胞アクチンフィラメントの微小ゆらぎの解析
3. 学会等名 第28回バイオフィロンティア講演会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 菅野健太、佐藤圭、古川淳、下権谷祐児、片岡則之
2. 発表標題 急拡大流路内渦形成部における培養内皮細胞の F-アクチンフィラメント及び形態変化
3. 学会等名 日本機械学会 第30回バイオフィロンティア講演会
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
研究協力者	阪口 政清  (Sakaguchi Masakiyo)	岡山大学・医学部・教授    (15301)	