

令和 3 年 5 月 24 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08639

研究課題名(和文) マイクロナノ基板を用いたEMTを介さない膵管腺癌の浸潤・転移のダイナミクス解析

研究課題名(英文) Dynamics of invasion/metastasis in pancreatic duct adenocarcinoma not through EMT using micro/nanoplate

研究代表者

宮武 由甲子 (Miyatake, Yukiko)

北海道大学・医学研究院・助教

研究者番号：10421984

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：膵管腺癌(PDAC)は、非常に急速に進行する。しかし、そのような発癌メカニズムは、部分的には生きたインビトロ腫瘍イメージング技術の欠如のために、主に観察診断法を通じて研究されている。研究代表者らは、PDAC微小腫瘍の動的可視化を可能にするマイクロパターンプレート(マイクロ・ナノ基板)を使用して、シンプルな生きた微小腫瘍の *in vitro* イメージング技術を開発した。本研究では、マイクロ・ナノ基板を使用して、ヒトPDAC微小腫瘍のダイナミクスに対する微小組織レベルでの上皮間葉転換(EMT)の影響を調べた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

独自に開発したマイクロ・ナノ基板は、癌細胞へ自発的に運動極性のある微小な癌腫瘍組織を構築させ、より患者体内の病態に近い癌組織の挙動を生きたままで観察できるこれまでにない3次元培養チップである。マイクロ・ナノ基板によって得られる、生きている癌腫瘍組織のダイナミクスに関する膨大な革新的知見が新薬開発分野へと広く波及すれば、現在行われている癌治療薬開発の仕組みをも変える革新的なデバイスとして役立つ可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) reportedly progresses very rapidly through the initial carcinogenesis stages including DNA damage and disordered cell death. However, such oncogenic mechanisms are largely studied through observational diagnostic methods, partly because of a lack of live *in vitro* tumor imaging techniques. We developed a simple live-tumor *in vitro* imaging technique using micro-patterned plates (micro/nanoplates) that allows dynamic visualization of PDAC microtumors. In this study, we examined the effects of EMT at the microtissue-level on the dynamics of human PDAC microtumors using the micro/nanoplates.

研究分野：実験病理学

キーワード：膵癌 三次元培養 EMT がん細胞 ライブイメージング 難治性がん ダイナミクス解析 ナノバイオ

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

(1) 膵癌は極めて予後不良な難治性固形癌である。診断時にはすでに進行癌であることが多く、5年生存率は7%前後と極めて低い。ほとんどの膵癌は膵管上皮から発生し、充実性腫瘍を形成して浸潤・転移を起こしやすい浸潤性膵管腺癌(PDAC)である。早期発見が困難であるうえに進行も速いため、初期段階のPDACにおける病態生理学的現象は不明な点が多い。

(2) PDAC細胞の浸潤・転移は、癌化した細胞が上皮間葉転換(EMT)することによって誘導されると考えられているが、最近、膵癌モデルであるKPCマウスにさらにEMT誘導遺伝子であるSnailまたはTwistを欠損させたKPCマウスにおいても、PDACの浸潤・転移がKPCマウスと変わらず誘導されることが報告された(Nature, 527, 2015, Nature, 547, 2017)。これらの結果は、PDAC腫瘍細胞にはEMTを介さないアグレッシブな浸潤・転移のメカニズムが存在することを示唆されており、極めて悪性度の高いPDACの病態理解への根本的な大きな変革が要求されている(Nature, 547, 2017)。

(3) 研究代表者らは、上皮系フィーダー存在下において、悪性腫瘍細胞は足場依存性の細胞集合体となり、治療抵抗性を容易に獲得することを報告してきた。同様の現象はPDAC細胞においても確認されている。近年の*in vitro*および*in vivo*ライブセルイメージング技術の進歩は目覚ましいものがある。

(4) しかし、*in vivo*における癌組織の病態生理学的な理解は、未だ大部分を画像診断学的手法や病理診断学的手法に頼っているのが現状である。もしも、これまで実現不可能であった、生きている膵癌組織がダイナミックに動く様子を*in vitro*で捉えることができたならば、得られる情報の価値は計り知れないと考える。

2. 研究の目的

異分野連携し、微細加工技術を応用して新たに開発した細胞培養用マイクロ・ナノ基板を用いて、運動極性を持ったマイクロスケールのPDAC細胞集合体(膵微小癌)を誘導、*in vitro*ライブイメージングから得られる情報をもとに、その病態生理学的ダイナミクスの分子機構を明らかにし、独自の視点から膵癌のアグレッシブネスの病理解明に挑んだ。

3. 研究の方法

(1) 組織運動極性を持った膵微小癌を効率的に*in vitro*で誘導できる三次元細胞培養のためのマイクロ・ナノ基板を開発し、それを用いたライブ微小癌イメージング技術を確立させた。

(2) 得られたマイクロスケールの膵微小癌における病態生理学的ダイナミクスが病理学的に有意なものであることを実証した。具体的には、新規性の高いダイナミクスに焦点をあて、それに関わる分子メカニズムを分子生物学的手法および細胞工学的手法により検証した。

4. 研究成果

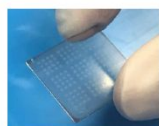
(1) 研究代表者らは、半導体製造に用いられる微細加工技術を応用して、3D細胞組織培養デバイスであるマイクロ・ナノ基板 (PCT/JP2018/014119) を開発し特許を取得した。

(2) マイクロ・ナノ基板は、EMT を起こす前段階の上皮形質を保った PDAC 細胞がダイナミックな組織運動極性を持った癌細胞 集合体組織 (微小腫瘍) への自発的分化を誘導できた。

(3) これにより、*in vitro*にてアグレッシブな挙動を示す PDAC 微小腫瘍のライブイメージングが可能となり、上皮形質のまま PDAC 細胞が集団化し、一つの組織として、あたかも飢えた多細胞生物のように這えずり伸張する様子をライブで捉えることに成功した。

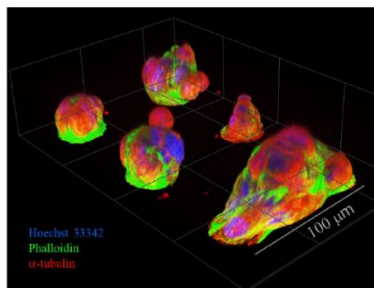
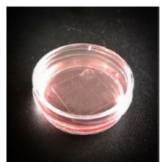
(4) 膵癌細胞の細胞集団化による 難治性に関する論文とマイクロ・ナノ基板の論文を発表し、マイクロ・ナノ基板の発明については、国内外で広く報道された。

マイクロ・ナノ基板の開発



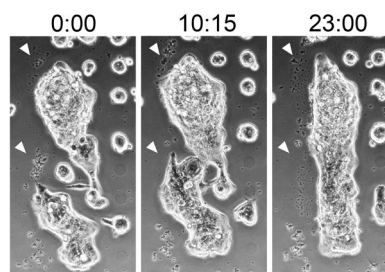
Micro/nanoplate
PCT/JP2018/014119

国際出願2018年4月1日



培養した癌細胞が微小な癌腫瘍組織を形成し、成長しながら動き回る様子を観察できる「マイクロ・ナノ基板」を開発した。

Miyatake Y, Scientific report, 2018



マイクロ・ナノ基板上に自己組織した膵癌腫瘍組織のタイムラプス

生きている膵癌腫瘍組織は、強固な足場を獲得することによって活発な運動能を獲得し、まるでひとつの生物のように触手を伸ばして死細胞カスを取り込み、巨大化する。(時:分)

(5) マイクロ・ナノ基板上で膵管腺癌 (PDAC) 細胞を一晩培養することによるライブイメージング解析の結果、PDAC 細胞は、マイクロパターン上に足場を獲得しながら生細胞による細胞内細胞浸潤(entosis)を起点にして、微小癌をZ軸方向へ自己組織化することがわかった。

(6) マイクロ・ナノ基板は、癌細胞培養するだけで、2D培養や一般的なスフェロイド培養では不可能であった、悪性度の異なる患者由来癌細胞のマイクロ組織レベルの特徴の違い(腫瘍サイズ、腫瘍伸長性、管腔への分化率等)を明らかにした。

(7) 上皮間葉転換 (EMT) の進行度の異なる PDAC 細胞株を用いた腫瘍ダイナミクス解析を行った。EMT が進行した微小腫瘍組織は、進行していないものに比較して、自己組織化される微小腫瘍組織はパターンを跨いで伸張せず、大きさも小さかった。また、間葉形質を獲得した細胞は微小腫瘍の表面に多く発現することが明らかとなった。

(8) マイクロ・ナノ基板によって得られる、*in vitro*でのマイクロ組織レベル解析である微小癌ダイナミクス解析は、これまでにない未踏の研究領域であるため、革新的な癌治療法開発へのヒントが大いに得られることが期待された。

< 引用文献 >

Miyatake Y, Kuribayashi-Shigetomi K, Ohta Y, Ikeshita S, Subagyo A, Sueoka K, Kakugo A, Amano M, Takahashi T, Okajima T, Kasahara M , Visualising the dynamics of live pancreatic microtumours self-organised through cell-in-cell invasion. Scientific Reports 8, 2018, Article number: 14054

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Miyatake Y, Kuribayashi-Shigetomi K, Ohta Y, Ikeshita S, Subagyo A, Sueoka K, Kakugo A, Amano M, Takahashi T, Okajima T, Kasahara M	4. 巻 8
2. 論文標題 Visualising the dynamics of live pancreatic microtumours self-organised through cell-in-cell invasion	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 14054
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-32122-w	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 -

1. 著者名 Miyatake Y, Ohta Y, Ikeshita S, Kasahara M	4. 巻 9
2. 論文標題 Anchorage-dependent multicellular aggregate formation induces a quiescent stem-like intractable phenotype in pancreatic cancer cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 29845-29856
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18632/oncotarget.25732	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 -

〔学会発表〕 計24件（うち招待講演 6件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 宮武 由甲子、繁富(栗林) 香織、太田 悠介、岡嶋 孝治、笠原 正典
2. 発表標題 自己組織化微小癌を誘導できるマイクロ・ナノ基板の開発
3. 学会等名 第3回がん三次元培養研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高野 勇太、宮武 由甲子、山田 勇磨、繁富 香織
2. 発表標題 革新的3次元培養デバイスを利用した高性能ミトコンドリア標的型がん治療薬の開発
3. 学会等名 第5回北海道大学部局横断シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮武 由甲子
2. 発表標題 初めて見えた！ 生きている悪性新生物の動き～マイクロ・ナノ基板の発明までの道のり～
3. 学会等名 国際ソロブチミスト旭川10月例会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 太田 悠介、宮武 由甲子、繁富 香織、天野 麻穂、高橋 利幸、岡嶋 孝治、笠原 正典
2. 発表標題 肺癌自己組織化を誘導する新規マイクロ・ナノ基板の開発
3. 学会等名 第99回 北海道医学大会 腫瘍系分科会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮武 由甲子、太田 悠介、繁富 香織、天野 麻穂、高橋 利幸、岡嶋 孝治、笠原 正典
2. 発表標題 EMTは肺微小癌における組織レベルの挙動に影響する
3. 学会等名 第99回 北海道医学大会 腫瘍系分科会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 太田 悠介、宮武 由甲子、笠原 正典
2. 発表標題 肺癌腫瘍組織の自己組織化を誘導するマイクロ/ナノ細胞培養基板の開発
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 繁富 香織、宮武 由甲子、太田 悠介、アグス スバギョ、末岡 和久、笠原 正典、岡嶋 孝治
2. 発表標題 癌腫瘍組織のダイナミクス観察のためのマイクロ・ナノパターン基板
3. 学会等名 第80回 応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤 一馬、繁富(栗林) 香織、宮武 由甲子、アグス スバギョ、末岡 和久、岡嶋 孝治
2. 発表標題 マイクロパターン基板上に形成する微小腫瘍のcell-in-cell構造の観察
3. 学会等名 2019年度 日本機械学会年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ohta Y, Miyatake Y, Kuribayashi-Shigetomi K, Ikeshita S, Subagyo A, Sueoka K, Kakugo A, Amano M, Takahashi T, Okajima T, Kasahara M
2. 発表標題 New micro-cell culture platform "micro/nanoplate" induces self-organization of microtumor in PDACs
3. 学会等名 The 38th Sapporo International Cancer Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 太田 悠介、宮武 由甲子、池下 隼司、笠原 正典
2. 発表標題 膵癌自己組織化を誘導する新規マイクロナノ基板の開発
3. 学会等名 第108回日本病理学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮武 由甲子
2. 発表標題 マイクロ細胞培養基板によって明らかとなった癌細胞の眞の姿
3. 学会等名 第1回 ファーマラボ EXPO - 医薬品研究開発 展 - (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮武 由甲子
2. 発表標題 がん組織挙動を簡単に体外で再現 - マイクロ・ナノ細胞培養基板の開発 -
3. 学会等名 バイオ関連研究シーズ公開会 in 北海道 経済産業省北海道経済産業局主催 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 太田悠介、宮武由甲子、繁富(栗林)香織、池下隼司、アグス・スバギョ、末岡和久、角五 彰、天野麻穂、高橋利幸、岡嶋孝治、笠原正典
2. 発表標題 マイクロ・ナノ基板を用いた肺癌腫瘍組織のダイナミクスの可視化
3. 学会等名 第4回北海道大学部局横断シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮武由甲子、繁富(栗林)香織
2. 発表標題 マイクロナノバイオデバイスによる肺癌オルガノイドのダイナミクス解析
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会主催 第38回研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 太田悠介、宮武由甲子、池下隼司、笠原正典
2. 発表標題 膵管腺癌細胞の細胞集団化における遺伝子プロファイルの臨床的関連性の検討
3. 学会等名 第98回北海道医学大会（第51回北海道病理談話会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 太田悠介、宮武由甲子、笠原正典
2. 発表標題 膵管腺癌細胞の足場依存性多細胞凝集塊における遺伝子プロファイルの変化
3. 学会等名 第77回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 太田悠介、宮武由甲子、池下隼司、笠原正典
2. 発表標題 膵管腺癌細胞における足場依存性多細胞凝集塊（Ad-MCA）形成による難治性形質の誘導
3. 学会等名 第107回日本病理学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宮武由甲子
2. 発表標題 マイクロナノバイオデバイスによって惹起されるがん細胞の自己組織化
3. 学会等名 NanoBio第11回若手ネットワークシンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宮武由甲子
2. 発表標題 マイクロナノデバイスによって惹起される微小癌のダイナミクス
3. 学会等名 第7回 蛍光イメージング・ミニシンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宮武 由甲子、繁富(栗林)香織,、太田 悠介
2. 発表標題 マイクロ・ナノ融合パターン基板を用いた微小癌自己組織の構築
3. 学会等名 第33回代用臓器・再生医学研究会総会/日本バイオマテリアル学会北海道ブロック第5回研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yukiko Miyatake
2. 発表標題 New micro-patterned 3D cell culture platform reveals unknown cancer behavior
3. 学会等名 The 21st RIES-HOKUDAI International Symposium(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 太田 悠介、宮武 由甲子、繁富 香織、天野 麻穂、高橋 利幸、岡嶋 孝治、笠原 正典
2. 発表標題 膵管腺癌におけるマイクロ組織レベルの治療抵抗性ダイナミクス
3. 学会等名 第100回 北海道医学大会 腫瘍系分科会(第122回北海道癌談話会例会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 太田 悠介、宮武 由甲子、笠原 正典
2. 発表標題 マイクロ組織レベルの膵管腺癌での治療抵抗性ダイナミクス
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 太田 悠介、宮武 由甲子、繁富 香織、大塚 紀幸、田中 敏、笠原 正典
2. 発表標題 膵微小癌における抗癌剤暴露によるライブ腫瘍ダイナミクスへの影響
3. 学会等名 第109回日本病理学会総会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計2件

産業財産権の名称 Cell culture substrate cancer cell aggregate and method for manufacturing same using said substrate, and drug screening method using said cancer cell aggregate	発明者 Yukiko Miyatake	権利者 Hokkaido univ.
産業財産権の種類、番号 特許、US20200063083	取得年 2019年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 細胞培養基材、がん細胞集合体及び該基材を用いたその製造方法、並びに該がん細胞集合体を用いた薬剤のスクリーニング方法	発明者 宮武 由甲子、繁富 香織、岡嶋 孝治、笠原 正典	権利者 北海道大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願 PCT/JP2018/014119	取得年 2018年	国内・外国の別 国内

〔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
研究分担者	笠原 正典 (Masanori Kasahara) (30241318)	北海道大学・医学研究院・教授 (10101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------