

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：16201

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21900

研究課題名（和文）In Vitro 3次元微小血管モデルによるがん細胞進化動力学

研究課題名（英文）In vitro three-dimensional blood capillary model for dynamics of cancer cell evolution

研究代表者

寺尾 京平（Terao, Kyohei）

香川大学・創造工学部・准教授

研究者番号：80467448

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：血液循環時の物理刺激が誘導するがんの転移に関する新たなメカニズムを解明するため、方法論として、生体内の3次元的な血管狭窄構造を正確に微細加工技術により再現し、そこを通過するがん細胞の挙動と機能を詳細に解析する技術を開発した。生体外に3次元的な血管狭窄部モデルを形成し、そこを通過するがん細胞の動態の蛍光イメージングおよび効率的な細胞サンプル回収機構を実現した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がんによる死の多くは転移を伴う。したがって、転移メカニズムの解明は急務であるが、生体内では血流中の細胞の動態を1細胞レベルで追跡することは、極めて困難であることから、本モデルにより細胞動態が解析できるようになることは、がん転移の理解につながることを期待される。細胞・核内の挙動や遺伝子発現・変異を1細胞解像度で解析することで、血流中ではがん細胞がどのように生き延び、そして他臓器への転移に至るのか、という疑問を細胞の物理的な挙動から理解することが可能になると期待される。

研究成果の概要（英文）：To elucidate the effect of mechanical constraints on circulating tumor cells, we developed a methodology that allows us to visualize the dynamics of cancer cells passing microconstrictions and to recover them for further analysis. The microconstrictions reproduce in-vivo capillary shape, which has circular micro cross section. Using the in-vitro model, we demonstrated the visualization of cell and cell nucleus in a constriction.

研究分野：マイクロ・ナノ工学

キーワード：血中がん細胞 マイクロ流体デバイス 血管狭窄部 毛細血管モデル

1. 研究開始当初の背景

がんによる死の多くは転移を伴う。したがって、転移メカニズムの解明は急務であるが、計測の困難さから未解明な点が多い。それに対し血液循環に着目し、どのように毛細血管の微小狭窄部をがん細胞が変形して通過するかという観点の研究が国内外で行われている。しかし、血液循環によってがん細胞自体の機能がどのように変化するのか、如何に転移につながるのかについては明らかになっていない。本研究では、血中のがん細胞が毛細血管を循環する過程で、どのように生き延びて転移に向けて進化するかという点に着目した。そこで、毛細血管の狭窄部を生体外に再現した *In Vitro* 微小血管モデルを開発することにより、がん細胞の挙動を解析することを目指した。

開始時の予備的知見として、がん細胞が狭窄部を通過することによって、A) 細胞核が大きく変形していること、B) 核内 DNA の二本鎖切断が生じること、C) 転移遺伝子の発現状態が変化していることが得られていた。つまり、血管狭窄部を通過する際の細胞の変形・回復挙動が物理刺激となって、遺伝子変異が生じ、遺伝的多様性を得るとともに転移機能を獲得する、つまり進化することを示唆していた。本研究では、この血液循環時の物理刺激が誘導するがんの転移に関する新たなメカニズムを解明するため、生体内の3次元的な血管狭窄構造を正確に微細加工技術により再現し、そこを通過するがん細胞の挙動と機能を詳細に解析するための技術開発に取り組むことを計画した。本技術が確立することで、がんの転移に関する新たな知見が得られることから、基礎生命科学与がん診断治療研究への貢献が期待できる。

2. 研究の目的

本研究は、がん転移過程における、がん細胞の進化プロセスを1細胞解像度で解析する技術の実現を目的とする。具体的には、血液を循環するがん細胞が毛細血管を通過するときに変形し、それによって遺伝子変異や発現状態の変化が生じ、「進化」することで転移能を獲得するという新たな仮説をマイクロデバイスによって検証する。つまり、物理刺激がトリガーとなってがん細胞が進化する過程を解明する新たな方法論を提案する。このアプローチを、本研究では「がん細胞進化動力学」とし、物理的側面から転移メカニズムの解明に繋げる。

本研究では、この血液循環時の物理刺激が誘導するがんの転移に関する新たなメカニズムを解明するため、方法論として、生体内の3次元的な血管狭窄構造を正確に微細加工技術により再現し、そこを通過するがん細胞の挙動と機能を詳細に解析する技術を実現することを目的とした。

3. 研究の方法

血中がん細胞が血管狭窄部を通過した際に生じる遺伝子発現の変化と遺伝子変異の蓄積を解析する方法論を実現する。それにより、血中がん細胞が如何にして血液循環中に「進化」し、他臓器への転移能を獲得するに至るのか、という疑問にアドレスする。そのために、毛細血管の狭窄部を再現した3次元マイクロ構造を半導体微細加工技術によって作製し、ライブイメージングによる狭窄部通過前後の1細胞毎の計測を通じて、がん細胞と細胞核内の物理的挙動について可視化するとともに、狭窄部通過後のがん細胞を回収し、遺伝子発現・変異を評価することで細胞機能の変化を1細胞解像度で解析する。具体的には、以下の3つの要素に関して、マイクロナノテクノロジーを用いて、装置及び手法の開発と評価を行い、血中がん細胞進化解析に関する新たな方法論を確立することに取り組んだ。

(1) *In Vitro* 微小血管狭窄部3次元モデルの開発：ヒトの血管最小狭窄部は直径約5,6 μm の円形に近い断面を持っていると考えられる。これを生体外で再現するため、ポリマーを利用した微小円形開口部形成手法を応用する。また、細胞を導入するマイクロ流体デバイスは研究開発当初に完成したプロトタイプを応用した。

(2) 変形・損傷・修復挙動の計測：蛍光顕微鏡下に(1)で製作したモデルを設置し、がん細胞をサンプルとして、狭窄部通過前後のがん細胞および細胞核の変形と形状回復に関するデータを物理刺激の履歴として取得するとともに、細胞内の核動態を蛍光ライブイメージングにより可視化し、進化の駆動因子として評価する。また、細胞・核形状時間変化の取得の自動化により効率的なデータ解析を実現する。

(3) 細胞の回収と遺伝子発現解析：遺伝子発現解析により、がんの転移に関わる機能の評価を行うため、狭窄部を通過した細胞群をマイクロ流体デバイスから効率的に回収する。そのために、細胞を狭窄部に均一に分配するマイクロ流路を、数値流体解析を利用して設計し、細胞を用いて評価を行った。

4. 研究成果

3つの研究開発要素に関して、マイクロナノテクノロジーを用いて、装置及び手法の開発に取り組んだ結果を以下に示す。

(1) In Vitro 微小血管狭窄部3次元モデルの開発：血管最小狭窄部である直径約5 μm の円形断面形状の再現を目標に加工技術の開発に取り組んだ。その結果、真円度0.91の円形断面を安定に形成できる微細加工条件を見つけ、加工法を確立した(図1)。また、本モデルを有したマイクロ流体デバイスを製作し、流体操作周辺環境を整備し、細胞挙動観察を効率的に実施可能なシステムを構築することに成功した。

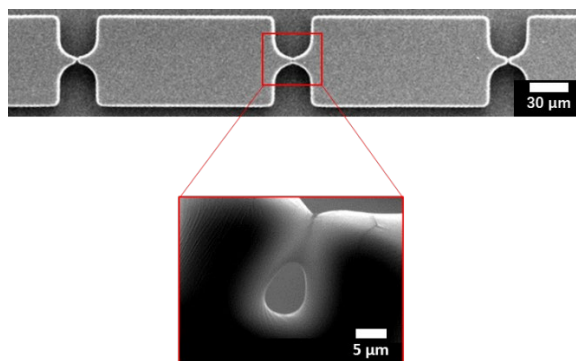


図1. 血管狭窄部3次元モデル

(2) 変形・損傷・修復挙動の計測：蛍光顕微鏡下に1)で作製したモデルを設置し、がん細胞をサンプルとして、狭窄部通過前後のがん細胞および細胞核の変形と形状回復に関するデータを物理刺激の履歴として取得するとともに、細胞内のクロマチン領域変化・DNA二本鎖切断を蛍光ライブイメージングにより可視化し、進化の駆動因子として評価する。

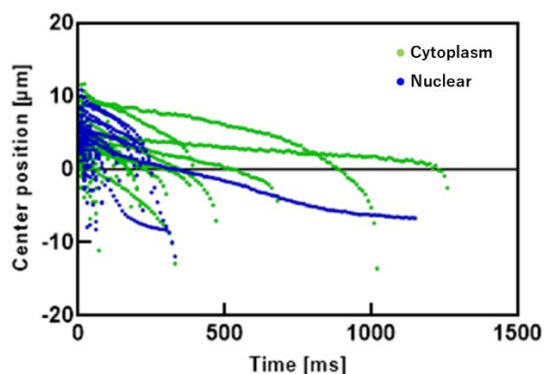
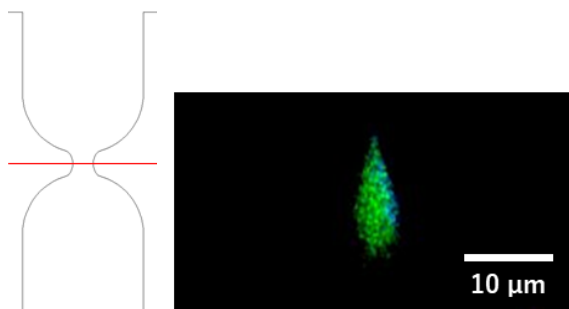


図2. 狭窄通過時の細胞の断面蛍光像と細胞質・細胞核位置の時間変化

研究期間内に、細胞の形状変形と回復挙動の観察に取り組み、細胞質と細胞核の動態データの取得に成功した(図2)。さらに性質の異なる複数種の細胞について細胞および細胞核の挙動データの取得を実施した。得られた蛍光動画から形状情報を自動で解析するプログラムを構築し、効率的なデータ取得が可能となった。

(3) 細胞の回収と遺伝子発現解析：狭窄部を通過した細胞群をマイクロ流体デバイスから回収し、特にがんの転移に関わる機能の評価を行う。

研究期間内に、遺伝子発現解析を安定に実施するため、多数の細胞を回収することができる、1)のモデルを大量並列に設置したハイスループットデバイスの開発に取り組む、細胞を使った評価実験を行った。流体分配機構を利用し、数値流体解析に基づき、狭窄部に細胞を効率的に誘導することができるデバイスを開発し、がん細胞を用いた評価実験によりその有用性を確認した。回収した細胞群の遺伝子発現評価などより詳細な解析を今後の計画としている。

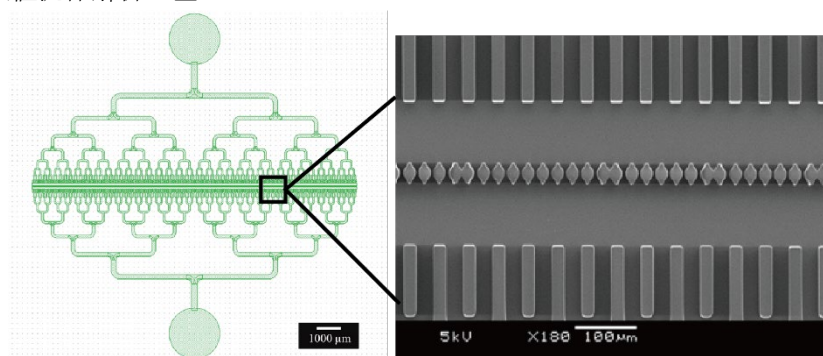


図3. 血管狭窄部3次元モデル通過細胞の効率的回収を目的としたマイクロ流体デバイス

以上に示すように、血管狭窄部を通過する細胞がどのような挙動を示すのか、という疑問を生体外で明らかにするための技術要素を実現した。それらを組み合わせ、細胞解析については、細胞質・細胞核それぞれの形状に関する動態データを取得することを可能にした。今後、ライブセルイメージング技術や、回収された細胞のオミクス解析を通じて血中がん細胞の機能の理解につながる事が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Takahashi Koki, Kamiya Shogo, Takao Hidekuni, Shimokawa Fusao, Terao Kyohei	4. 巻 11
2. 論文標題 Stainless microfluidic probe with 2D-array microapertures	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 AIP Advances	6. 最初と最後の頁 015331 ~ 015331
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1063/5.0014119	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 Takahashi Koki, Takao Hidekuni, Shimokawa Fusao, Terao Kyohei	4. 巻 26
2. 論文標題 On-demand formation of heterogeneous gel fibers using two-dimensional micronozzle array	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microfluidics and Nanofluidics	6. 最初と最後の頁 15 ~ 15
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10404-022-02525-3	査読の有無 有
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 Terao Kyohei, Kondo Shohei	4. 巻 22
2. 論文標題 AC-Electroosmosis-Assisted Surface Plasmon Resonance Sensing for Enhancing Protein Signals with a Simple Kretschmann Configuration	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Sensors	6. 最初と最後の頁 854 ~ 854
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/s22030854	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6件（うち招待講演 1件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 白神吉洋、高尾英邦、下川房男、寺尾京平
2. 発表標題 血中がん細胞解析に向けた3次元毛細血管狭窄部モデルの開発
3. 学会等名 第37回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 K. Terao
2. 発表標題 Single Cell Analysis using Nano-Micro Devices
3. 学会等名 The 14th International Conference on Complex Medical Engineering (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 E.Gasser,K.Terao,J.L.Viovy,J.Y.Pierga,C.Villard
2. 発表標題 Microfluidic in Vitro Models for Studying Circulating Tumor Cells Fate in The Microvasculature
3. 学会等名 25th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2021) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 K.Takahashi,H.Takao,F.Shimokawa,K.Terao
2. 発表標題 Two-Dimensional Microaperture Array for On-Demand Formation of Heterogeneous Gel Fibers
3. 学会等名 25th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2021) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Y.Shiraga,H.Takao,F.Shimokawa,K.Terao
2. 発表標題 In Vitro Three-Dimensional Model of Capillary Microconstriction for Imaging Cancer Cell Dynamics
3. 学会等名 25th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2021) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 十河広斗、伊藤義純、高尾 英邦、下川 房男、寺尾 京平
2. 発表標題 狭窄通過細胞集団の効率的回収に向けたマイクロ流体デバイスの開発
3. 学会等名 第38回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム
4. 発表年 2021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

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			
フランス	Institute Curie			