

令和 6 年 5 月 29 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K12679

研究課題名（和文）多孔性高機能ハイドロゲルを用いたin vitro3D神経膠芽腫組織の創出

研究課題名（英文）Creation of in vitro 3D glioblastoma tissue using porous highly functional hydrogel

研究代表者

王 磊（WANG, LEI）

北海道大学・化学反応創成研究拠点・特任助教

研究者番号：70637975

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、Porous化した高機能ハイドロゲルを用いて、GSCニッチェを創出することで、ヒトの脳内病変を模倣したGBM組織を再構築する。そしてGSCニッチェがGSCを制御・維持するしくみを解明し、それに基づくGSCに特異的な治療法の開発を目指す。申請者らは、北大オリジナル高機能高分子ソフト&ウェットゲルを用いて高速・効率的かつ再現性が高い幹細胞の誘導法を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は高機能高分子ソフト&ウェットゲルを用いて高速・効率的かつ再現性が高い幹細胞の誘導法を開発した。さらにPorous化した高機能ハイドロゲルを用いて、GSCニッチェを創出することでヒトの脳内病変を模倣したGBM組織を再構築し、GBM幹細胞の性質の解明に貢献した。よって、本研究は次世代の個別化医療の実現に期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we use a highly functional porous hydrogel to create a GSC niche and reconstruct GBM tissue that mimics human brain lesions. We will also elucidate the mechanism by which the GSC niche controls and maintains GSCs, and aim to develop GSC-specific treatments based on this. Because treatment resistance and recurrence are caused by the repopulation of GBM cancer stem cells (GSCs), it is necessary to understand the nature of GSCs and develop treatments to eradicate GSCs. Applicants have developed a rapid, efficient, and highly reproducible stem cell induction method using Hokkaido University's proprietary high-performance polymer soft wet gel. In this study, we develop this guidance method, create a GSC niche using a highly functional porous hydrogel, and reconstruct GBM tissue that mimics human brain lesions. We will also elucidate the mechanism by which the GSC niche controls and maintains GSCs, and aim to develop GSC-specific treatments based on this.

研究分野：病理学

キーワード：癌 癌幹細胞 脳腫瘍 ハイドロゲル シグナル

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 現在癌の分子標的治療、免疫チェックポイント阻害剤などで多くの癌の予後が改善されているが、悪性脳腫瘍（神経膠芽腫 Glioblastoma, GBM）は治療抵抗性が高く、再発が多く、5年生存率は8%以下と予後が極めて悪い。治療抵抗性と再発はGBMのがん幹細胞(GBM stem cell, GSC)が再増殖するため、GSCの性質を知り、特異的に標的とする治療法の開発が必要である。しかしながら、GSCはがん組織中に微量であり、症例ごとにマーカーも異なり、同一組織の中で多様性があるため研究論文は多数あるが、実臨床での治療標的には至っていない。申請者らは、北大オリジナル高機能高分子ソフト&ウェットマター（以下、高機能ハイドロゲル）を用いて高速・効率的ながん幹細胞の誘導法を開発した。本研究はこの誘導法を発展させて、Porous化した高機能ハイドロゲルを用いて、GSCニッチを創出することで、ヒトの脳内病変を模倣したGBM組織を再構築する。そしてニッチがGSCを制御・維持するしくみを解明し、それに基づくGSCに特異的な治療法の開発を目指す。

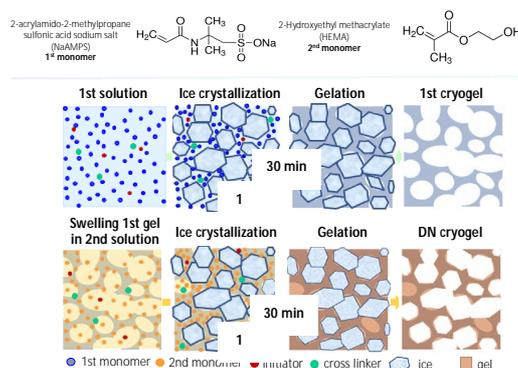
(2) 本研究では、この多孔ゲルを、ハイドロゲルの有する物理因子である弾性率と荷電密度を変化させることで、血管内皮及び周皮細胞を最適に増殖させる外部環境を創りだし、最終的に悪性脳腫瘍GBMのがん幹細胞が維持・増殖する3次元組織を構築する。現在のがん治療の喫緊の課題は、治療抵抗性・再発の原因となる「がん幹細胞の根絶」である。特に悪性脳腫瘍GBMは予後不良であるため治療法の開発が望まれるが、GBMはチロシンキナーゼの発現が高いにもかかわらず、多くの臨床治験によってTK阻害剤などの分子標的治療薬も効果が見られず、免疫チェックポイント阻害剤も効果が乏しい。GBMの有効な治療法が開発されない原因の1つは2D培養で効果を判定していたことにある。よって、GBMの治療薬開発戦略には、GBM幹細胞が生み出すヘテロジェニティを模倣した、3次元モデル組織の構築が必要である。本研究はバイオマテリアルを用いてこの課題に取り組むものである。

### 2. 研究の目的

本研究の核心は、「悪性脳腫瘍GBMのがん幹細胞(GSC)は、どのように細胞周囲環境と相互作用して、がん組織の多様性を作り出すのか？」その仕組みを明らかにするものである。独創性の高いバイオマテリアルを用いて、ヒトの組織構築を模倣した3Dモデルを作り出すことで、最終的には悪性脳腫瘍のがん幹細胞(GSC)に対する特異的な治療法を確立する。

### 3. 研究の方法

(1) Porous化した高機能ハイドロゲルの作成: 右図が示すように、1stモノマーにNaAMPSを用いて、凍らせて内部に無数の氷の結晶を作り、この状態でUV重合しゲル化した。氷だった部分を解かすとポラス構造をもったゲルが得られた。2ndモノマーには、コンタクトレンズに用いられる生体適合性の高いHEMAを使い、2段階重合して、ポラスDNゲルを得た。



(2) 血管内皮細胞及び周皮細胞と臨床患者由来したGBM細胞の共培養:

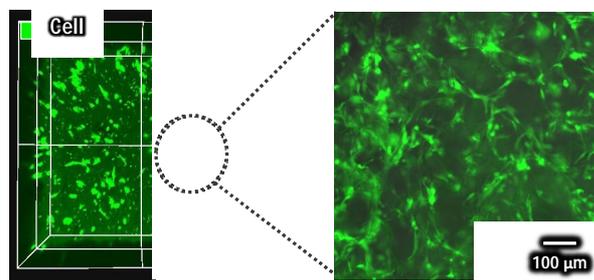
様々なPorous化した高機能ハイドロゲルは血管内皮細胞及び周皮細胞と臨床患者由来したGBM細胞の共培養を行なった。Pore sizeは66µm及び硬さ0.3MPaほどで細胞共培養可能となった。

(3) 北大化合物ライブラリーから耐性細胞標的治療薬シーズ創出: 北大オリジナル化合物ライブラリーから大規模スクリーニングを行なった。In vitroで新規GBMの阻害剤は同定した。

### 4. 研究成果

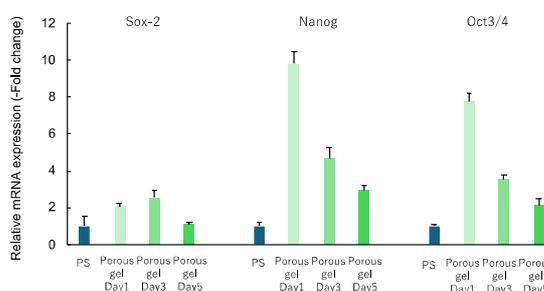
I. 血管内皮及び周皮細胞を用いた血管網の構築に最適なPorous高機能ハイドロゲルの創出:

ゲルの物理特性として、力学的性質および電荷密度の2点に着目する。力学的にハイドロゲルは生体軟組織と同程度の弾性率を有し、弾性率は調製可能なため、引張試験・動的粘弾性試験により培養基盤の粘弾性的性質を定量化する。物理因子を調節することで目的に特化した細胞に対して最適な高機能ゲルを作成。また、右図が示すように HEMA 濃度の調整で、最適な pore サイズ  $66\ \mu\text{m}$  及び硬さ  $0.3\text{MPa}$  ほどで血管内皮及び周皮細胞に対して最適な培養する高機能ゲルを作成した。



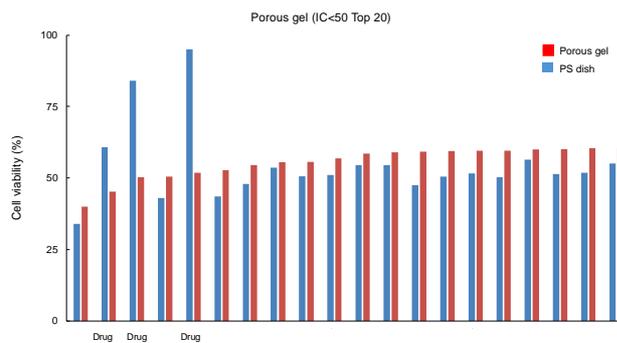
## II. GBM 培養細胞株及び臨床手術検体由来初代 GBM 細胞から *in vitro* で porous 化した高機能ハイドロゲル 3D 培養モデルの構築：

GBM 培養細胞株を高機能ハイドロゲル上で培養すると幹細胞様 sphere が形成され、幹細胞マーカー発現亢進した。このことはハイドロゲルが、分化したがん細胞のリプログラミングを誘導して、がん幹細胞 (CSC) を創り出した (右図)。本研究では患者由来の初代培養細胞を用いて、がん幹細胞を作りだし、微小環境の中で長期培養することで、幹細胞の変化と異なるクローンに基づく、多様性を有するヒト GBM 組織を模倣した 3D モデルを構築出来た。



## III. Porous 化した高機能ハイドロゲルモデルを用いて、*in vitro* で北大化合物ライブラリーから新規治療薬の同定：

Porous 化した高機能ハイドロゲルモデルを用いて、*in vitro* で北大化合物ライブラリーから大規模スクリーニングを行なった。10  $\mu\text{M}$  で第一次スクリーニングして、Drug X, Y, Z の候補因子を同定した。以前の報告では、Drug X は強力なサバイピン抑制剤であり、乳がん細胞ではサバイピンと XIAP を下方制御し、オートファジーを調節し、オートファジー依存性の DNA 損傷を誘導する。Drug Y では Raf-1 及び B-Raf



のマルチキナーゼ阻害剤であり、VEGFR、PDGFR シグナルを阻害することは報告され、オートファジーとアポトーシスを誘導し、抗腫瘍活性によりフェロトーシスを活性化させる。Drug Z では腫瘍選択的なフルオロピリミジンカルバメートであり、5-FU よりも低い毒性でより高い腫瘍内 5-FU レベルを達成し、アポトーシスを誘導する。

本研究の特徴は Porous 化した高機能ハイドロゲルによる *in vitro* で 3D 癌組織の構築は従来の方法 (マトリゲル法、オルガノイド法) と比べ、高機能ハイドロゲルの弾性率と荷電密度を変化させることで、最適な癌幹細胞周囲ニッチ増殖させる外部環境を創出した。かつては本来高機能ハイドロゲル上で培養すると短時間で幹細胞濃縮・誘導することで、最大限癌幹細胞維持することも可能となり、それにより臨床検体に近い環境を作り出し可能であることが示唆された。さらに短時間で幹細胞濃縮・誘導することで、大規模スクリーニングを行うことが可能であり、次世代の個別化医療の実現を期待することが出来る。

<引用文献>

(1) Suzuka J, Tsuda M, Wang L, Kohsaka S, Kishida K, Semba S, Sugino H, Aburatani S, Frauenlob M, Kurokawa K, Kojima S, Ueno T, Ohmiya Y, Mano H, Yasuda K, Gong JP, Tanaka S.

Rapid induction of reprogramming towards cancer stem cells on double-network hydrogels  
*Nature Biomedical Engineering*, accept in press, 2020.

(2) Yuzawa S, Nishihara H, Wang L, Tsuda M, Kimura T, Tanino M, Tanaka S. Analysis of NAB2-STAT6 gene fusion in 17 cases of meningeal solitary fibrous tumor/hemangiopericytoma – review of the literature. *Am J Surg Pathol*, 2016;40(8):1031-40.

(3) Yuzawa S, Nishihara H, Yamaguchi S, Mohri H, Wang L, Kimura T, Tsuda M, Tanino M, Kobayashi H, Terasaka S, Houkin K, Sato N, Tanaka S. Clinical impact of targeted amplicon sequencing for meningioma as a practical clinical sequencing system. *Mod Pathol*, 2016; 29 (7):708-16.

(4) Ye YN, Frauenlob M, Wang L, Tsuda M, Sun TL, Cui K, Takahashi R, Ahang HJ, Nakajima T, Nonoyama T, Kurokawa T, Tanaka S, Gong JP. Tough and self-recoverable thin hydrogel membranes for biological applications. *Advanced Functional Materials*, 2018, 28, 1801489.

(5) Yanagi T, Watanabe M, Hata H, Kitamura S, Imafuku K, Yanagi H, Homma A, Wang L, Takahashi H, Shimizu H, Hatakeyama S. Loss of TRIM29 promotes cell invasion in squamous cell carcinoma via alterations in keratin distribution. *Cancer Research*, 2018 Dec 15;78(24):6795-6806.

(6) Yoshida K, Tsuda M, Matsumoto R, Semba S, Wang L, Sugino H, Tanino M, Kondo T, Tanabe K, Tanaka S. Exosomes containing ErbB2/CRK induce vascular growth in premetastatic niches and promote metastasis of bladder cancer. *Cancer Science*, 2019;110:2119–2132.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	谷川 聖  (Tanikawa satosi)  (00823353)	北海道大学・化学反応創成研究拠点・特任助教    (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