

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20512

研究課題名（和文）細胞外マトリクス内のがん細胞の空間的位置や密度が細胞挙動や機能に与える影響の解明

研究課題名（英文）Elucidating the effects of the spatial location and density of cancer cells within the extracellular matrix on cell behavior and function.

研究代表者

小林 真子（Kobayashi, Mako）

東北大学・工学研究科・助教

研究者番号：70908912

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 1,700,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、がん細胞にとって生体組織により近い細胞外マトリクス環境を提供できれば生体様がん微小環境を再現できるのではないかと発想のもと、その実現に向けた条件探索のために、生体組織由来の細胞外マトリクスである脱細胞化組織由来ゲル（dECMゲル）を材料として、3Dバイオプリンターでがん細胞を3次元に配置し、細胞挙動や機能発現を評価することを目的とした。異なる脱細胞化法や組織により種々の特性を有するdECMゲルが作製でき、これらががん細胞の増殖や進展に影響を与えることが示唆された。また、細胞含有dECMゲルの3D印刷の条件検討を行い、dECMを用いた3Dがん組織モデル設計に必要な要素探索を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、がんは日本人の死因第1位である。しかしながら、がんの浸潤・転移の機序については未解明な点が多く、治療法確立に至っていない。本研究により、生体組織由来の細胞外マトリクスである脱細胞化組織由来ゲルががん細胞挙動に与える影響や3Dバイオプリンティングでの3D構造体の作製条件についての検討が進み、3Dがん組織モデルを構築するために必要な要素を提案することができた。また、本研究結果で得られた知見は、がん微小環境の構築に関与するがん細胞挙動の解明につながり、がんの浸潤・転移の機序解明や治療法開発の一助になることが期待できる。

研究成果の概要（英文）：This study was conducted based on the idea that if we could provide an extracellular matrix environment that is more similar to living tissue for cancer cells, it would be possible to mimic a cancer microenvironment. To explore to realize the development of in-vivo like 3D cancer model, the objective of this study was to evaluate the 3D placed-cancer cells behavior within the decellularized tissue derived hydrogels (dECM hydrogels), an extracellular matrix derived from living tissue. It was suggested that different decellularization methods and tissues could produce dECM hydrogels with various properties, and that these could affect the proliferation and progression of cancer cells. In addition, we investigated the conditions for 3D bioprinting of cell-containing dECM hydrogels and explored the elements necessary for designing 3D cancer tissue models using dECM.

研究分野：生体材料学

キーワード：細胞外マトリクス がん 脱細胞化組織 3Dバイオプリンティング サポートバス

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

がんの浸潤・転移の機序については未解明な点が多い。その理由として、がん組織の不均一性と複雑性が挙げられる。がん細胞は周囲の様々な正常細胞や細胞外マトリクス成分と相互に影響しあうことで、増殖・転移のしやすい、治療抵抗性ながん微小環境を構成する。従って、がん微小環境の構築に関与する因子やがん細胞挙動の解明により、がんの浸潤・転移の機序解明や治療法開発が期待できる。これまで、2D 平面培養したがん細胞を用いて研究が行われてきたが、2D 培養は生体内環境とは大きく異なるため、不均一で複雑ながん微小環境を形成できなかった。そこで近年、3D がん組織モデルによるがん微小環境の構築が検討されている。ゼラチンとアルギン酸に HeLa 細胞を封入させた 3D 子宮頸がんモデルでは、2D 培養では再現できなかった化学療法抵抗性が示された。また、マトリゲルに卵巣がん細胞と線維芽細胞を封入して作製した 3D 卵巣がんモデルでは自発的に多細胞で構成された腺房が形成され、がん組織の不均一性が再現された。このように、がん細胞、複数種の正常細胞、細胞外マトリクスを混合させることで生体様がん微小環境を構築できることが示唆され、これらの複雑な相互作用ががん組織形成に重要であることがわかってきた。以上の背景より、がん細胞にとって、生体組織により近い細胞外マトリクス環境を提供できれば、がん細胞が本来有する機能や挙動を引き出すことができ、細胞形態や増殖、浸潤・転移、薬剤耐性を模倣した生体様がん微小環境を構築できるのではないかとの発想に至った。

2. 研究の目的

本研究では、がん細胞と細胞外マトリクスの関係性に着目し、細胞外マトリクス中に 3 次元的に配置されたがん細胞の挙動を評価し、生体様がん微小環境の構築に寄与する要素を探索することを目的とした。目的を達成するために、第一のステップとして、種々の脱細胞化組織由来ゲル（dECM ゲル）を作製し、その特性評価とがん細胞挙動に与える影響を評価した。第 2 のステップとして、dECM ゲルをバイオインクとして印刷可能な条件探索と 3D 構造体中のがん細胞挙動を評価した。

3. 研究の方法

(1) 種々の脱細胞化組織由来ゲル（dECM）の作製と特性評価

ブタ小腸粘膜下組織（SIS）と膀胱組織（UBM）、肝臓を界面活性剤法（SDC 法）と高静水圧法（HHP 法）にて調製し、脱細胞化 SIS、UBM、肝臓を得た。H-E 染色、残存 DNA 定量により脱細胞化を評価した。脱細胞化 SIS、UBM、肝臓を凍結乾燥後に粉末化し、Pepsin 溶液で溶解することで、dECM 溶液を調製した。pH および塩濃度を調整後、dECM 溶液をインキュベートすることで、dECM ゲル（SIS、UBM のみ）を調製した。ゲルの繊維構造を走査電子顕微鏡（SEM）にて観察し、力学特性を圧縮試験にて評価した。また、dECM ゲル中の成分についてポリアクリルアミド電気泳動（SDS-PAGE）を用いて評価した。

(2) dECM ゲル上のがん細胞挙動評価

コラーゲンゲルおよび dECM ゲル上にヒト子宮頸がん由来細胞（HeLa 細胞）やヒト結腸がん由来細胞（Caco-2 細胞）をそれぞれ播種し、所定時間培養後、Calcein-AM 染色により細胞接着性、増殖性を評価した。

(3) dECM ゲルをバイオインクとした 3D バイオプリンティングの条件検討

柔らかいゲルである dECM を印刷するために、ゼラチンをベースとした支持浴の作製検討を行った。得られた支持浴中で、3D バイオプリンター (LulzbotBio) を用いて dECM ゲルの印刷可能なパラメータ (印刷スピード、インフィル密度など) を検討した。

(4) 脱細胞化肝臓粉末とアルギン酸ナトリウムゲルを用いた 3D 構造体の作製と細胞挙動評価

凍結乾燥後に粉砕した脱細胞化肝臓を 2% のアルギン酸ナトリウムゲルに混合し、バイオインクを作製した。ゼラチンベースの支持浴を用いて 3D 印刷が可能な条件を探索した。バイオインクにヒト肝がん由来細胞 (HepG2) を包埋し、CAD ソフトで作製したミニ肝臓モデルを印刷した。支持浴に CaCl_2 溶液を添加し、 37°C で 1 時間インキュベートすることで、支持浴から 3D 構造体を取り出した。培養液に浸漬させ、所定時間培養後、Calcein-AM 染色により細胞増殖性を評価した。

4. 研究成果

(1) 種々の脱細胞化組織由来ゲル (dECM ゲル) の作製と特性評価

DNA 定量および H-E 染色により、全ての脱細胞化組織において脱細胞化が確認された。また、圧縮試験および SEM 観察より、種々の dECM ゲルは異なる弾性率を有しており (Figure 1)、形成したコラーゲン繊維構造にも違いが認められた (Figure 2)。コラーゲン溶液と dECM 溶液の SDS-PAGE の結果により、コラーゲンでは検出されなかった複数のバンドが dECM 溶液では認められたことから、生体組織由来の種々の分子が多く混在していることが示唆された (Figure 3)。

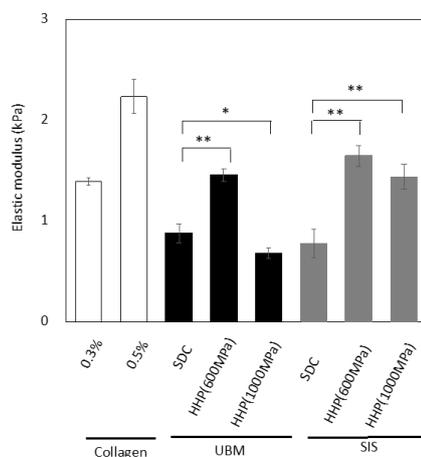


Figure 1. Elastic modulus at 10% strain range of collagen hydrogels and dECM hydrogels.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

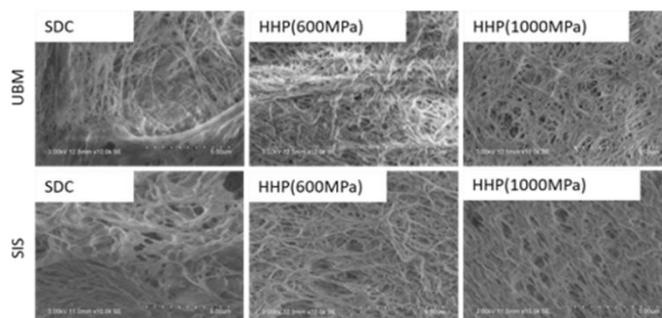


Figure 2. SEM images of the surface of dECM hydrogels at 0.8%. Scale bar: 5 μm

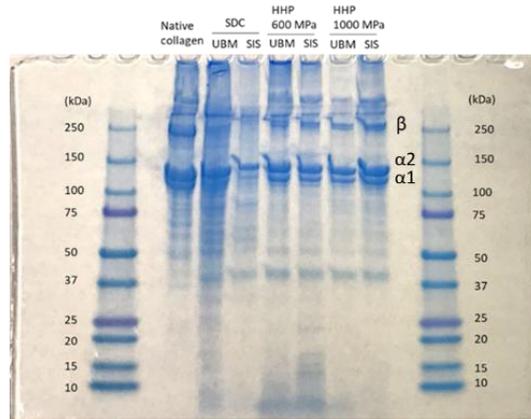


Figure 3. SDS-PAGE analysis of native collagen and pepsin-digested dECM tissues (4-15%).

(2) dECM ゲル上のがん細胞挙動評価

dECM ゲル上で培養した HeLa 細胞や Caco-2 細胞は、コラーゲンゲルと同等かそれ以上の初期接着性を示し、コラーゲンゲル上よりも高い増殖率を示した (Figure 4, 5)。この結果から、dECM ゲル中に含まれる様々な生理活性物質が、HeLa 細胞や Caco-2 細胞の接着・増殖に影響し、生体様の細胞挙動を模倣している可能性が示唆された。

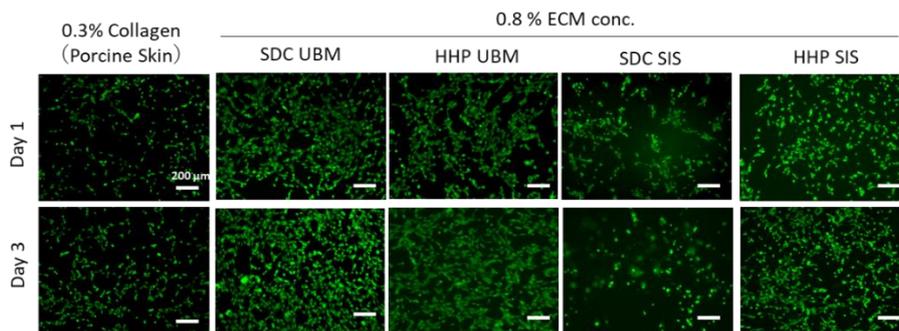


Figure 4. Calcein-AM stained HeLa cells on TCPS, collagen gel and dECM hydrogel at Day1 and Day3.

Scale bar : 200 μm

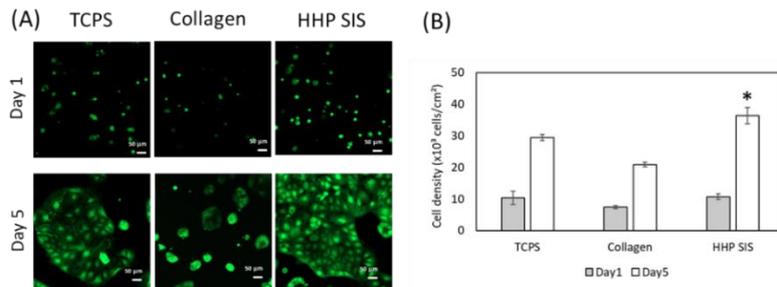


Figure 5. (A) Calcein-AM stained Caco-2 cells on TCPS, collagen gel and dECM hydrogel at Day1 and Day5. Scale bar: 50 μm . (B) Cell density. The cell density of each sample was compared to Day 1. Asterisk (*) indicates statistical significance in comparison with TCPS and collagen gel. $*p < 0.05$.

(3) dECM ゲルをバイオインクとした 3D バイオプリンティングの条件検討

ゼラチンベースの支持浴中での dECM ゲルの印刷可能な条件について検討を行った。検討の結果、現状の dECM ゲルでは、支持浴を用いた印刷であっても、印刷後に形状が維持できないことがわかった。現在、dECM ゲルとコラーゲンゲルを組み合わせることでゲルの弾性率を向上させ

る検討などを行い、3D バイオプリンターで印刷可能なバイオインクの作製を進めている。

(4) 脱細胞化肝臓粉末とアルギン酸ナトリウムゲルを用いた 3D 構造体の作製と細胞挙動評価

(3)で dECM ゲル単体では印刷ができなかったことから、脱細胞化肝臓粉末をアルギン酸ナトリウムゲルに混合したバイオインクを作製し、印刷を試みた。印刷条件パラメータは、検討の結果、インフィル密度 80%、印刷速度 50 mm/s に定まった。バイオインクに HepG2 細胞を包埋し、ミニ肝臓がんモデルの印刷を行った。支持浴除去前後の印刷物を Figure 6 に示した。よって、形状を維持したまま、支持浴を除去できることが明らかとなった。

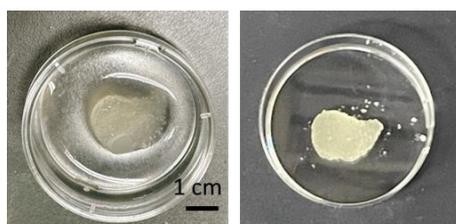


Figure 6. 3D printed mini liver (left) before and (right) after the removal of supporting bath.

作製した 3D 構造体を培養液に浸漬させ、培養 1, 3, 5, 14 日後に Calcein-AM 染色を行い、レーザー共焦点顕微鏡で観察した結果の一部を Figure 7 に示した。アルギン酸ナトリウムゲル単体と dECM 粉末を混合したアルギン酸ナトリウムゲルのいずれにおいても、HepG2 細胞が生着している様子が観察されたが、dECM 粉末を加えたゲル中ではがん細胞の良好な増殖が観察された。また、14 日経過後は、アルギン酸ナトリウムのみの 3D 肝臓では細胞凝集体が観察され、細胞生着数の減少が見られたが、dECM 粉末混合ゲルで作製した 3D 肝臓では細胞が良好に増殖し、進展している様子が認められた。よって、dECM 粉末に含まれる生理活性物質が 3 次元に配置されたがん細胞の生存、増殖に関与することが示唆された。

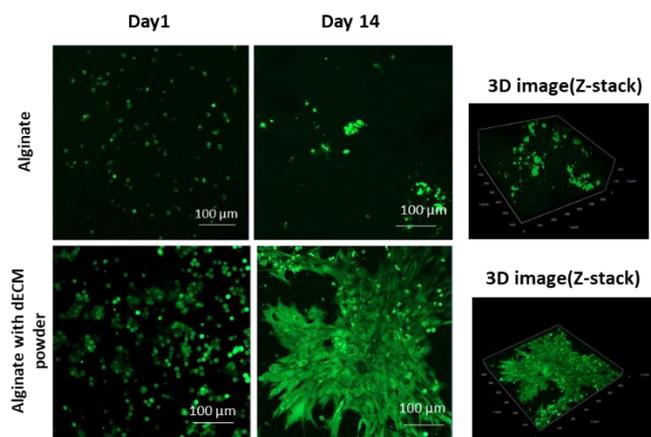


Figure 7. Calcein-AM stained HepG2 cells within 3D printed mini liver prepared by alginiate and alginiate with dECM powder at Day1 and Day14. Scale bar : 100 μm

以上より、種々の dECM ゲルや dECM 粉末が 2D、3D 環境下でがん細胞の生存、増殖に影響することが明らかになり、がん微小環境を構築する上での細胞外マトリクスの重要性が示された。また、支持浴を用いた dECM 粉末混合ゲルの 3D バイオプリンティング法の検討を通じて得られた知見は、3D がん組織モデルの設計の実現につながることを期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 4件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 小林真子, 石田直樹, 橋本良秀, 根岸淳, 嵯峨秀樹, 佐々木善浩, 秋吉一成, 木村剛, 岸田晶夫 |
| 2. 発表標題 高静水圧法により作製した種々の脱細胞化組織由来マトリクス結合型ナノベシクルの評価 |
| 3. 学会等名 第8回日本細胞外小胞学会学術集会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Mako Kobayashi, Naoki Ishida, Yoshihide Hashimoto, Jun Negishi, Hideki Saga, Yoshihiro Sasaki, Kazunari Akiyoshi, Tsuyoshi Kimura, Akio Kishida |
| 2. 発表標題 Extraction of matrix-bound nanovesicles (MBVs) from high-hydrostatic pressure decellularized tissue and evaluation on vascular endothelial cells |
| 3. 学会等名 TERMIS-2021(Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society-World Congress2021) (国際学会) |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Mako Kobayashi, Yoshihide Hashimoto, Jun Negishi, Hideki Saga, Yoshihiro Sasaki, Kazunari Akiyoshi, Tsuyoshi Kimura, Akio Kishida |
| 2. 発表標題 The evaluation of matrix-bound nanovesicles (MBVs) derived from various high-hydrostatic pressure decellularized tissues |
| 3. 学会等名 第43回日本バイオマテリアル学会大会 第8回アジアバイオマテリアル学会 併催 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 小林真子, 橋本良秀, 根岸淳, 嵯峨秀樹, 佐々木善浩, 秋吉一成, 木村剛, 岸田晶夫 |
| 2. 発表標題 種々の脱細胞化組織由来マトリクス結合型ナノベシクルの評価 |
| 3. 学会等名 令和3年度生体医歯工学共同研究拠点成果報告会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Mako Kobayashi, Naoki Ishida, Yoshihide Hashimoto, Jun Negish, Hideki Saga, Takehiro Iwanaga, Yoshihiro Sasaki, Kazunari Akiyoshi, Tsuyoshi Kimura, Akio Kishida |
| 2. 発表標題 The effects of matrix-bound nanovesicles (MBVs) derived from high-hydrostatic pressure decellularized tissues on neural regeneration. |
| 3. 学会等名 TERMIS AP 2022 (国際学会) |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 小林真子, 石田直樹, 橋本良秀, 根岸淳, 嵯峨秀樹, 佐々木善浩, 秋吉一成, 木村剛, 岸田晶夫 |
| 2. 発表標題 高静水圧法により作製した脱細胞化組織由来マトリクス結合型ナノベシクル (MBVs) の神経再生への機能評価 |
| 3. 学会等名 第9回日本細胞外小胞学会学術集会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Mako Kobayashi, Tsuyoshi Kimura, Akio Kishida, Masaya Yamamoto |
| 2. 発表標題 The effect of decellularized tissue-derived hydrogels on cancer cell behavior. |
| 3. 学会等名 The 7th International Symposium on Biomedical Engineering (ISBE2022) (国際学会) |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 小林真子, 石田直樹, 橋本良秀, 根岸淳, 嵯峨秀樹, 佐々木善浩, 秋吉一成, 山本雅哉, 木村剛, 岸田晶夫 |
| 2. 発表標題 種々の脱細胞化組織由来マトリクス結合型ナノベシクル (MBV) の神経再生への効果 |
| 3. 学会等名 第12回DDS再生医療研究会・第14回多血小板血漿 (PRP) 療法研究会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Lucas COLLET, Mako Kobayashi, Masaya Yamamoto |
| 2. 発表標題 Freeform Reversible Embedding of Suspended Hydrogel (FRESH) 3D bioprinting using Decellularized Extracellular Matrix (dECM) powder based bio-ink. |
| 3. 学会等名 TOHOKU University 2022-2023 FALL Semester JYPE & COLABS |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Mako Kobayashi |
| 2. 発表標題 Factors contributing to the functionality of decellularized tissues. |
| 3. 学会等名 JSPS-NRF Bilateral Program Mini-Symposium on Advanced Biomaterials for Tissue Engineering, and Tissue Synthesis and Manipulation (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 小林真子, 石田直樹, 橋本良秀, 根岸淳, 佐々木善浩, 秋吉一成, 山本雅哉, 木村剛, 岸田晶夫 |
| 2. 発表標題 脱細胞化脳・胎盤由来 マトリクス結合型ナノベシクル (MBV) の抽出と神経機能修復への効果検討 |
| 3. 学会等名 第35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7回研究会 |
| 4. 発表年 2023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 |
|---------|---------|
|---------|---------|