

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：82609

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24650156

研究課題名(和文)がん細胞仮想培養系を用いた増殖抑制効果の評価と予測

研究課題名(英文)Evaluation and prediction of antiproliferative activity in cancer multicellular spheroids in silico

研究代表者

立野 玲子(MINAMIKAWA-TACHINO, Reiko)

公益財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム医科学研究分野・主任研究員

研究者番号：70150208

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：3次元培養下でのがん細胞の増殖抑制を評価し、予測するがん細胞仮想培養系の開発を全体構想として、本研究ではその基盤となる仮想培養系を構築した。

本仮想培養系では、増殖試験の記録画像の解析結果と一致するように、細胞構造体であるスフェロイドの形成過程を計算で擬態している。生まれた細胞に培養開始からの世代数を付与したスフェロイド世代数分布とスフェロイド切片を染色して特定した壊死領域を比較検討した。壊死した世代数を仮定して求めた壊死割合に矛盾がないことを確認した。これにより仮想培養系による内部を含めたスフェロイド増殖活性の評価の可能性が示唆された。本研究により仮想培養系の意義を確認し、その基盤を開発した。

研究成果の概要(英文)：We have developed a prototype of in silico cancer multicellular spheroid assay. The goal is evaluation and prediction of antiproliferative activity in cancer spheroid forming process. A forming process is simulated based on time-laps images of the in vitro spheroid assay process. The consistency of these process is preserved by matching both growth curves. As for a cellular particle, the number of generation from the first in the spheroid forming process is assigned as its attribute. The necrotic region is generally specified by stained sections of spheroids. Volume ratio of the obtained necrotic region to the spheroid was roughly estimated. When necrotic generation would be assumed in silico, the volume ratio of the necrotic generation to the whole was estimated. These ratios were approximately equal. They imply there did not exist contradiction in these ratios and demonstrate the in silico assays have the possibility of evaluation and prediction of antiproliferative activity.

研究分野：バイオイメージ・インフォマティクス

キーワード：in silico がん細胞 3次元培養 スフェロイド 増殖シミュレーション 壊死 バイオイメージ・インフォマティクス バイオインフォマティクス

1. 研究開始当初の背景

3次元培養下で形成されるスフェロイドは細胞の凝集塊であり、単層培養によるコロニーより細胞密度が高く、細胞極性や細胞間相互作用、代謝能が長時間維持される。そのため、細胞は生体内に近い機能や挙動を示すことが知られており、スフェロイドはがん治療研究での細胞増殖試験に適すると考えられていた。しかし、スフェロイドの特性を踏まえた評価法がなく、多くの場合単層培養での試験と同様な方法で評価されていた。

さらに、スフェロイドの中心部の細胞は壊死状態にあることも知られていたが、一般にはスフェロイドの切片を染色して、壊死状態を確定していた。染色したスフェロイドを切断することなく光学断面像を得て、内部状態を確定する検討も進められていたが、厚みのある試料から確実に耐える像を得るのは現在でも困難である。このような内部の特性を捉える取り組みでは、1細胞からの連続的な変化を内部も含めて解析するのは不可能である。経過時間によって異なる個体を調べるのでは、特性評価において決定的な欠陥を内包することになる。このように、スフェロイドの特性を反映させて増殖試験を評価できず、スフェロイドは治療法研究に有効に活用されていないのが現状であった。

一方、がんの増殖過程を数理モデルで捉える試みは1960年代から始められた。近年ではモデル化の対象が単層培養から3次元培養へと徐々に移行してきたが、3次元計算空間で個々の細胞の状態を計算した上で、挙動を計算する増殖シミュレーションの研究はまれであった。しかも、そのシミュレーションは計算空間に閉じており、実空間のスフェロイドとの対応を図り、スフェロイドを用いた増殖試験の評価系へとスフェロイド形成シミュレーションを発展させる構想は描かれていなかった。

2. 研究の目的

本研究の全体構想は、3次元培養法で得られるがん細胞のスフェロイドを用いた増殖試験において、増殖抑制効果をスフェロイドの特性を踏まえて客観的に評価し、その抑制の原因が推測でき、さらにその因子を変化させた場合の抑制効果が予測できるプラットフォームとしてのがん細胞仮想培養系の構築である。

本研究では、その基盤となるスフェロイド形成過程のシミュレーションである仮想培養系を構築する。それによってスフェロイドを用いた増殖試験の評価と予測への実現可能性を確かめることが本研究の目的である。

また、これまでもがん細胞の増殖モデルは研究されているが、決定論的数理モデルと確率論的モデルはそれぞれ別のアプローチとして構築されてきた。本研究では、両者を組み合わせた新規モデルを構築する。

3. 研究の方法

基盤となる仮想培養系は、細胞増殖とスフ

エロイドの形成を細胞生物学と物理学の観点から簡素に捉えてスフェロイド形成過程のモデルを構築する。そのため、まず増殖だけで形成する培養法を対象とした。

仮想培養系でのスフェロイド形成シミュレーションを増殖試験の評価と予測に用いるために、培養過程のスフェロイドを一定時間間隔で撮影し、形成過程を画像に記録した。この記録画像をもとに、実空間と計算空間との対応を図る。

仮想培養系では細胞を球とみなし、スフェロイドを細胞球の構造体である球体とした。1細胞から始まる記録画像から単位となる細胞球の大きさを特定し、各記録画像のスフェロイド内の推定細胞数を算出した。

仮想培養系においても現実の培養法と同様に、培養器の栄養はスフェロイドの形成に消費され、時間経過とともに培養器の栄養は減少するとした。残存する栄養はスフェロイド表面の細胞に供給され、そこでさらに消費された残りの栄養がスフェロイドの中心に向かって徐々に細胞に届けられるとした。

細胞増殖は栄養と環境の影響を受けることから、仮想スフェロイドの細胞も供給された栄養と周囲の環境で支配される細胞周期に従って増殖するとした。生まれた細胞は周囲の細胞間で引力と斥力が釣り合う位置まで移動し、実際のスフェロイドのように仮想スフェロイドにおいても力学的に安定した状態が維持されている。さらに、各細胞には培養開始からの世代数が付与されている。

このようなスフェロイド形態モデルと細胞増殖モデルで仮想培養系を構築した上で、記録画像から推定される増殖曲線と仮想培養系での増殖曲線が一致するように、仮想培養系での増殖を調整し、実空間と計算空間を対応づけた。

仮想スフェロイドの細胞球には、属性として世代数が付与されているため、その分布が実スフェロイドの切片を染色して確定される壊死領域と矛盾しないかを確認した。

既存抗がん剤を用いた増殖抑制効果を検討する予定であったが、増殖試験の本実験での培養過程の記録で、解析に適する画像が得られなかった。また、最近の3次元培養法の急速な進展を考慮し、増殖しつつ、移動し、接着する培養法へと変更した。現在は、モデルの拡張に取り組んでいるところである。

具体的な研究の方法は以下の通りである。

(1) 培養実験と培養過程の記録 (分担: 小倉)

HeLa細胞を軟寒天培養法で15日間培養した。その間、培養装置に持ち込まれた顕微鏡で3時間毎にスフェロイドの顕微鏡像を撮影し画像として記録した。

また、培養過程を記録した実験と同じ条件でHeLa細胞を培養し、得られたスフェロイドをホルマリン固定し、作製した切片をHE染色して、スフェロイド内部での壊死状態を確定した。

(2) 記録画像からの細胞数推定 (分担: 立野)

スフェロイドを細胞球の構造体である球体としてモデル化するため、記録開始画像の1細胞の大きさから単位細胞球を推定した。各記録画像からスフェロイド領域を抽出し、その大きさから推定されるスフェロイド球に単位細胞球が面心立方格子構造で配置されると仮定して、内包する単位細胞球数を算出し、推定される細胞数とした。

(3)推定増殖曲線の多様性解析(分担:立野)

同一条件の培養でもスフェロイドの大きさ・形状には多様性がある。これは記録画像から推定した増殖曲線での静止期に至る過程に依存することが判明した。スフェロイド形成シミュレーションがこの多様性への適応性を有するかを確認するためにも、推定増殖曲線の多様性を解析した。一般的なロジスティック関数である5つのパラメータで制御されるRichard curveを用いて推定増殖曲線を近似し、増殖曲線を5次元ベクトルとした。そこで推定増殖曲線のベクトル群をKarhunen-Loève展開し、分散最大基準に従い、因子負荷量値から危険率5%で2次元へと削減し、静止期に至る過程の特徴平面を作成した。第1象限が明瞭な移行を示す静止期、第2象限が急激に移行する静止期、第3象限が緩やかに移行する静止期、第4象限が滑らかに移行する静止期と特徴づけられた。

(4)スフェロイド形態モデル(分担:永山、立野)

スフェロイドは、細胞を粒子とする粒子モデルを採用した。細胞は六方細密充填構造で配置され、スフェロイドには、単純立方構造配置より多く、六方細密充填構造の配置より少ない細胞数が存在するとした。この構造を維持するため、細胞粒子間力として引力と斥力を導入した。粒子間力は、六方細密充填構造を仮定した理論値を用いて記述した。

培養器でスフェロイドを形成するために必要な基質や酸素などの栄養は、形成するにつれて消費され、残存する栄養は減少する。細胞数に応じて栄養消費量が増加するに伴い、残存する栄養が減少する過程において、培養開始を1として、刻々と減少する栄養指数を栄養消費率は一定と仮定して求め、それがスフェロイド表面の細胞に供給されるとした。さらに栄養拡散式を定義して内部で拡散させて個々の細胞に供給した。細胞における栄養拡散に関する文献が見つからなかったため、血管からの酸素拡散距離の文献に準じた拡散距離を栄養拡散距離とした。栄養がある限り、拡散距離まで近傍の細胞に栄養を届けた。

(5)増殖モデル(分担:永山、立野)

増殖速度は、栄養状態に密接に関係するとともに、近傍の細胞密度に影響される。また、実際に中心部は壊死状態であることが確認されており、細胞はスフェロイドにおける自らの位置に応じたストレスを受けるとした。表層で受けるストレスは小さいが、内部に向かうにつれて受けるストレスは増大すると

した。細胞ごとに、栄養指数である栄養因子と近傍での細胞密度とストレスによる環境因子を求め、それらによって定められた細胞周期に従って細胞は分裂し、生まれた細胞を近傍の細胞間で引力と斥力が釣り合う位置まで移動させた。さらに、細胞には培養開始からの世代数を付与した。

記録画像で培養初期での増殖速度を計測して、最大増殖速度を推定した。増殖モデルは、最大増殖速度のときの細胞周期が栄養因子と環境因子の影響を受けて、長期化するとした。ここで、栄養と環境の因子に係わる緩和係数を設定し、これらの係数をパラメータとして仮想培養系を制御するとした。

(6)パラメータの最適化(分担:立野)

仮想培養系を用いたスフェロイドによる増殖試験の評価と予測には、スフェロイド形成シミュレーションで使用するパラメータの決定法が肝要となる。そこで画像推定とふたつのパラメータでシミュレーション計算した細胞数に対して評価関数を導入した。両者の差を画像推定細胞数で正規化し、この差の培養期間中での平方和を評価関数とした。本増殖モデルでのパラメータの最適化は、栄養因子と環境因子のそれぞれの軸で張られる平面での評価関数の極小値の探索とした。できるだけ少ない回数で広い値域を探索できるように、それぞれ固有の等比数列で刻まれる目盛りを設定する。探索には4段階の階層をもたせ、第1段階では、増殖に及ぼす影響が環境因子より単純に捉えられる栄養因子を初期値に固定し、環境因子の軸で間隔を空けた目盛りの点で評価関数を計算し、最小となる点を探索する。第2段階では、その最小となった点を中心とする周り8点を含む9点で評価関数を最小とする点を探索し、次の探索基点とする。第3段階では、その探索基点の環境因子の軸は固定し、栄養因子の軸の目盛りに沿って評価関数を計算し、最小となる点を探索する。第4段階では、第2段階と同様に、その最小となった点を中心とする周り8点を含む9点で評価関数を最小とする点を探索する。得られた点の栄養因子と環境因子の軸の値の組み合わせを最適化されたパラメータとした。

4.研究成果

記録画像から細胞数を推定した増殖過程について、画像推定と本仮想培養系での増殖曲線が一致する仮想スフェロイドを求めた。

静止期に至る過程によって特徴づけられる多様な増殖過程に対して、パラメータの最適化による機械的な処理によって、第4象限の滑らかに移行する静止期部分を除いて両者を一致させることができた。この第4象限で特徴づけられる増殖過程で、10日目まではほぼ一致しているが、それ以降の僅かずつ増殖して滑らかに静止期に移行する過程が仮想培養系では11日に静止期に至り増殖が停止した。最終の細胞数はほぼ一致しており、本仮想培養系はスフェロイド形成過程の多様

性に対してほぼ適応することを確認した。

増殖試験で得られたスフェロイドでの壊死領域と仮想スフェロイドの世代数分布で壊死世代数を仮定した仮想壊死領域で、形態が似ている壊死領域について比較検討し、試料での概算壊死割合と矛盾しない壊死割合となる仮定世代数が求められることを確認した。また、形態と概算壊死割合は、静止期に至る過程の特徴によって異なることが仮想スフェロイドによって判明した。これらから仮想スフェロイドを用いた内部を含めたスフェロイド増殖活性に関する評価法の実現可能性が示唆された。

本研究では、仮想培養系の基盤構築を目的とし、軟寒天培地での増殖によるスフェロイド形成過程の記録画像を解析して、ロジスティック関数を用いた決定論的数理モデルによる増殖モデルと、栄養因子と環境因子の程度が細胞周期に影響する増殖モデルを構築した。スフェロイドに対して、その増殖モデルは、両モデルでの増殖曲線が一致するように調整することによって、両者を組み合わせた新規モデルを構築した。さらに、切片試料の壊死領域とスフェロイドで壊死した世代数を仮定して求めた壊死割合に矛盾がないことを確認し、この実空間と計算空間との対応づけの妥当性を実証した。

本研究によって、仮想培養系の意義が確認でき、基礎的ながん細胞仮想培養系のプロトタイプの構築に成功した。

現在も増殖しつつ、移動し、接着するスフェロイド培養系での抗がん作用の評価と予測に向け、記録画像からの細胞移動と接着についての解析結果を反映させた仮想培養系の検討を続けている。また、3次元細胞培養は再生医療と創薬を支える基盤技術としても注目されており、本研究で構築した仮想培養系の応用も検討していきたい。

本研究に協力いただいた株式会社ニコンインストルメンツカンパニー、SCIVAX ライフサイエンス株式会社に、深く感謝いたします。

5. 主な発表論文等

(研究代表者が、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計 10件)

Ito A., Nagayama K., Minamikawa-Tachino R., Ogura K.: Modeling and Simulation on Cancer Cell Migration and Adhesion. The 3rd BMIRC, 2015.3.5, Ikeno-Okuen Garden and 3.6, Nogami President Hotel (Fukuoka・Tagawa and Iizuka).

Ito A., Nagayama K., Ogura K., Minamikawa-Tachino R.: A Formation Model of Multicellular Cancer Spheroids, 15th ICSB, 2014. 9. 14-18, Melbourne, Canada.

立野玲子, 伊藤文音, 永山勝也, 小倉潔: 「培養記録画像に基づく3次元仮想培

養系の検討」, 第23回日本バイオイメーシング学会 学術集会 2014. 9. 4-6, 大阪大学銀杏会館(大阪・吹田市).

伊藤文音, 永山勝也: 「がんスフェロイド増殖抑制の評価と予測に向けた数値シミュレーション」, 日本機械学会九州学生会第45回卒業研究発表講演会, 2014. 3. 4, 九州大学伊都キャンパス(福岡・福岡市).

立野玲子: 「がん治療法の数理・情報学的基盤の研究開発 抗がん剤開発における評価と予測をめざして」, 九州工業大学バイオメディカルインフォマティクス研究開発センター講演会, 2013. 12.16, 九州工業大学(福岡・飯塚市).

Minamikawa-Tachino, R., Itoh, A., Nagayama, K., and Ogura, K.: “3D structured models of multi-cellular cancer spheroids”, The 15th ICBME 2013. 2013 12. 4-7, Singapore.

立野玲子, 赤池 早紀, 永山勝也, 小倉潔: 「がん細胞のスフェロイド形成シミュレーションの試行」, 第22回日本バイオイメーシング学会 学術集会 2013. 9. 15-16, 東京大学(東京・文京区).

Minamikawa-Tachino, R., Akaike, S., Nagayama, K., and Ogura, K.: “Growth simulation of multicellular cancer spheroid”, 35th Annual Conference of IEEE EMBC 2013, 2013. 7. 3-7, Osaka International Convention Center (Osaka・Kita-ku).

立野玲子, 鈴木 勇, 小倉潔, 永山勝也: スフェロイド分布としてのがん細胞増殖過程の解析. 日本バイオイメーシング学会第21回学術集会, 2012.8.27-28, 国立京都国際会館(京都・左京区).

Minamikawa-Tachino, R., Tomita, H., Nagayama, K., Ogura, K.: An analytical approach for growing simulation of multicellular cancer spheroid. 13th ICSB, 2012.8.19-23, Toronto, Canada.

6. 研究組織

(1)研究代表者

立野 玲子 (MINAMIKAWA-TACHINO, Reiko)
公益財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム医科学研究分野・主任研究員
研究者番号: 70150208

(2)研究分担者

小倉 潔 (OGURA, Kiyoshi)
公益財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム医科学研究分野・主任研究員
研究者番号: 70233492

(3)研究分担者

永山 勝也 (NAGAYAMA, Katsuya)
九州工業大学・大学院・情報工学研究院・准教授
研究者番号: 70363398