

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 20 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25282145

研究課題名(和文)がん細胞シート工学による革新的3次元がん組織モデルの構築

研究課題名(英文) Cancer cell sheet tissue engineering for development of innovative three-dimensional cancer tissue models

研究代表者

中山 正道 (Nakayama, Masamichi)

東京女子医科大学・医学部・講師

研究者番号：00338980

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：シート状がん細胞組織(がん細胞シート)を利用した新しいがん組織工学の構築を追究した。細胞シート移植法による生体組織への細胞移植効率と腫瘍形成能の向上においてその有効性を明らかにした。さらにマウス肝組織へのがん細胞シート移植による同所移植肝がんモデルの構築に成功した。また、がん細胞シートを埋包したコラーゲン薄状ゲルサンドイッチ複合体を作製し、がん組織に見られる低酸素環境や物質の拡散制御などの生体内微小環境を模倣した3次元がん組織モデルを提案するとともに、薬物評価ツールとしての有効性を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Novel cancer tissue engineering has been developed using sheet-like cancer cell structures, cancer cell sheets, to overcome current artificial cancer fabrication methods for anticancer drug screening. We transplanted cancer cell sheets to small animals and clarified effective tumor formation. In addition, orthotopic liver cancer models were successfully achieved by transplantation of hepatocarcinoma sheet to host liver tissue. Moreover, an in vitro tumor model was constructed by sandwiching a cancer cell sheet between two collagen layers as a biomimicking tumor tissue. In the biomimicking tumor tissue model, hypoxic areas were observed, and the secretion of vascular endothelial growth factor increased time-dependently. Cell growth inside the model was slower than that of conventional culture system. Cytotoxicity of doxorubicin with the model decreased compared with the conventional system, suggesting that the surrounding collagen layer mimicked in vivo tumor structure.

研究分野：バイオマテリアル

キーワード：がん 細胞シート 組織工学 がんモデル 薬剤応答性

1. 研究開始当初の背景

抗がん剤スクリーニングでは、*in vitro* 細胞培養系と *in vivo* 担がんモデル動物を用いた前臨床研究により評価される。しかし、これらのスクリーニングの精度はそれほど高くなく、ヒト疾患に対する薬物効果の予測とその信頼性には問題がある。現在のがんモデルは、実際のヒト腫瘍の本質的な特徴が明らかに欠如しており、これが薬物スクリーニングにおいて妨げとなっている。*in vitro* 系では、同質のがん細胞を2次元培養したものを使用するが、細胞機能や抗がん剤に対する感受性が異種細胞どうし(がん細胞-間質細胞/血管内皮細胞等)で構成された生体内組織と異なるため、限定的な薬物データしか得られない。このため *in vitro* 系における信頼性を向上させるには、生体内がん組織の形態学的・機能的特徴を模倣した3次元組織を構築する必要がある。一方、*in vivo* 系における問題点として、モデル動物の腫瘍形成の移植場所と免疫系の有無が挙げられる。一般的な疾患動物の作製では、がん細胞懸濁液を皮下に注入する手法(インジェクション法: 簡便な手法であるが、細胞生着率に問題がある)を用いる。皮下という場所により腫瘍成長を容易に監視できるものの、宿主内で異所性の部位、すなわち、本来生じる解剖学的な場所と違っており、組織形態・機能および薬物応答が異なり、結果的に臨床試験における候補薬物の効果予測が弱まる。またヒトがん細胞株で評価する場合、宿主として免疫不全動物を用いるが、免疫系ががんの増殖性と薬物応答性に及ぼす影響は十分に評価できない。このように現在利用可能ながんモデルが不十分で、薬物の臨床的有効性を臨床試験前に正確に予測することが難しいことは、製薬業界に毎年数億ドルものコストを負担させており、新規薬物を開発する上で、大きな障害となっている。スクリーニングの精度と重要性を高めるためには、実際のがん組織の形態的・生物学的機能を有する組織を作製する技術が必要である。特に(i)同所性移植した免疫保持型(野生型)担がんモデル動物の作製技術と(ii)生体系に近い*in vitro* 3次元がん組織モデルの構築はきわめて重要な課題である。

2. 研究の目的

東京女子医科大学の研究グループは、32に相転移温度をもつポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)(PIPAAm)を基板表面に固定化し、温度変化のみで細胞接着性タンパク質など細胞表面構造を損なうことなくシート状細胞組織(細胞シート)として剥離・回収できる温度応答性培養基材を用いた手法に世界に先駆けて成功した。細胞シートの特性を利用し、種々の培養基材への移動やシートの積層化、非縫合による生体組織への貼付という新しい細胞マニピュレーションを可能にする「細胞シート工学」を提案かつ実現して

いる。本課題では、従来のがん組織モデルの問題点を大きく克服することを目的として、これまでに確立した細胞シート工学的手法を利用することで、より生体環境に近いがん組織モデルを再現する次世代がん組織工学について追究する。

本研究では、温度応答性培養皿を用いて作製した各種臓器がん由来のがん細胞シートを利用し、3次元がん組織モデルの構築を行う。

(1) 各種臓器がん由来の細胞シートの作製

がん細胞種としては、マウスおよびヒト由来の肝臓がん、肺がん、乳がん細胞を中心に検討した。細胞の接着・増殖性および細胞シートとしての剥離性は各細胞特有の性質である。本研究では、グラフトしたPIPAAm層の膜厚とグラフト量をさまざまに制御した温度応答性培養基材を用いて効率的ながん細胞シートの作製技術の確立を行う。

(2) がん細胞シートの同所性移植による担がんモデル動物の作製法の確立と評価

担がんモデルマウスを作製する手技として、がん細胞シートを貼付することでがん細胞を標的とする同所性組織に効率よく移植する手法を確立する。移植における細胞生着率、がん組織増殖性、および形成する組織学的評価について、従来インジェクション法と比較検討することで、その違いを明確にする。また野生型と免疫不全型動物について同様の実験を行い、免疫機構が及ぼす移植がん細胞の生着率と形成するがん組織の違いについて明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 温度応答性培養表面を用いたがん細胞シートの作製

温度応答性培養基材を用いて種々のがん細胞シートを作製する。温度応答性培養表面上にがん細胞株を播種後、コンフルエント状態まで培養した細胞を20°Cの低温処理により回収する。一方、移植に用いる細胞シートは、異なる培養面積を有する基材を用いて、シートのサイズにより細胞数を制御した。作製した各種がんシートは、薄切切片を作製し、免疫染色後に組織学的解析を行う。

(2) がん細胞シートの移植効率とがん増殖能の検討

宿主組織に対するがん細胞シートの生着率と移植後のがん増殖能の基礎的評価を行うために、がん細胞シートのマウス皮下組織への移植実験を行う。ルシフェラーゼ遺伝子導入型がん細胞シートを支持膜により剥離し、マウス背部を切開し、皮下に細胞シートを貼付した後、皮膚を縫合する。細胞シート法による細胞移植効率の有効を検証するために、酵素処理あるいは浮遊培養により回収したがん細胞懸濁液を同様の箇所にインジェクションする手法と比較する。がん細胞の生着率については、*in vivo* 発光イメージングシステム(IVIS)を用いてがん細胞由来の

ルシフェリン発光量を測定することにより評価する。がん増殖能に関しては、ノギスによるサイズ計測に加え、IVISによる撮画像から腫瘍体積を算出することで総合的に評価する。また形成した腫瘍について組織学解析を行う。さらに野生型と免疫不全型動物に同様の操作を行うことで、免疫系の有無が細胞生着率、がん増殖能等に及ぼす影響について検討する。

一方、マウスがん細胞シートの同所性移植による担がんモデルマウスを作製・評価を行った。同所移植臓器としては、肝臓を対象とする。評価はIVISやマイクロCTにより行う。腫瘍の組織薄切切片を作成し、がん組織の形態学的特徴を検討する。また抗がん剤ドキシソルピシンを用いた薬理効果の評価について、従来の異種性部位移植で作製した疾患モデル動物と比較し、同所性移植モデルの有効性を評価する。

(3) in vitro 3次元がん組織モデルの検討

ヒト肝臓がん細胞株(HLE)由来の細胞シートを2枚1型コラーゲンからなる薄膜ゲルの間にサンドイッチし、がん細胞シートを取り囲むコラーゲンゲルをがん間質の模倣構造としたがん組織模倣型組織を構築する。構造体内部における細胞シートの低酸素環境および血管増殖因子(VEGF)の分泌量を解析する。また、通常の2次元培養系と比較検討するとともに、ドキシソルピシンに対する薬物応答性の違いについて検討した。

4. 研究成果

PIPAAmの鎖長やグラフト密度を調整した温度応答性培養表面などを用いて、マウスおよびヒト由来の乳腺、肺、肝臓がんの細胞株からがん細胞シートを作製することが可能であった(図1)。

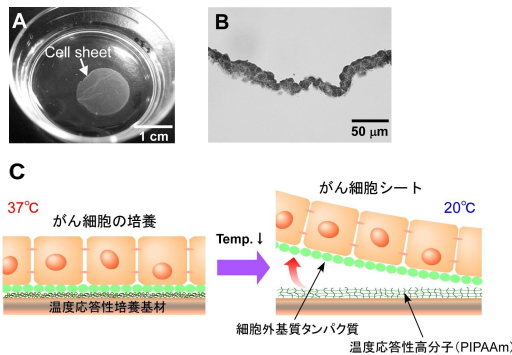


図1 (A)4T1細胞シートの写真, (B)4T1細胞シートの組織切片像, (C)温度応答性培養基材を用いた細胞シートの作製

がん細胞シートの生体組織への生着率および腫瘍形成能を評価するために、ルシフェラーゼ陽性マウス乳がん細胞(4T1)由来あるいはマウス肺扁平上皮がん細胞(KLN205)由来の細胞シートをマウス皮下組織に移植した(図2)。皮下組織に貼付すると10分程度で安定に生着することが明らかとなった。

4T1細胞シートを移植した系では、ノギスを用いた腫瘍体積の経日変化を追跡した結果、細胞注入法と比較して、細胞シート移植法において明確な腫瘍体積の増加が確認された(図3)また、移植1日後にin vivo発光イメージングにより移植細胞を観察すると、高い組織生着力をもつ細胞シート移植では細胞懸濁液の注入移植よりも10倍以上高い発光強度が観察された(図4)。

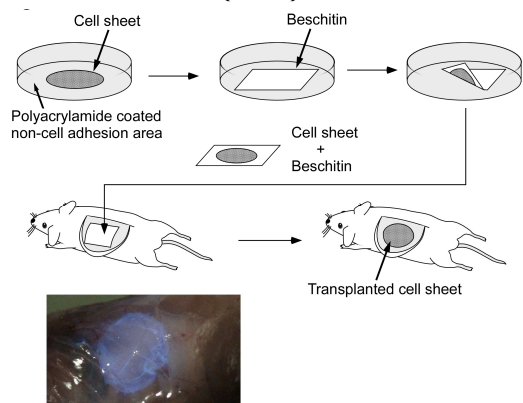


図2 マウス皮下へのがん細胞シート移植法および皮下組織に生着したがん細胞シート像(細胞核を蛍光染色)

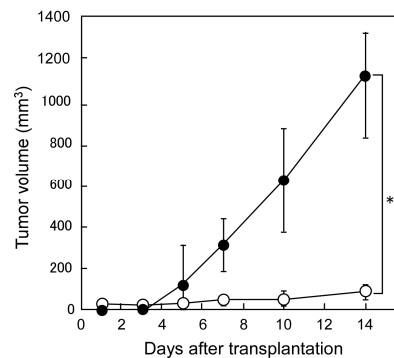


図3 細胞シート移植法(○)および細胞懸濁液注入法(●)による形成した4T1細胞由来の腫瘍体積の経日変化

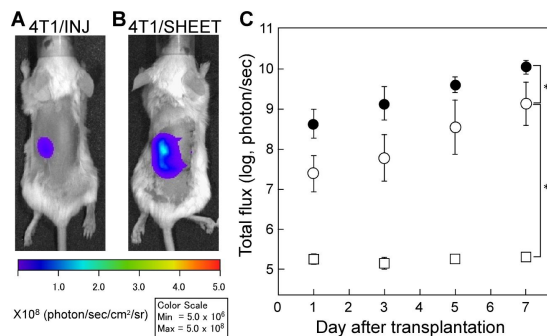


図4 in vivo発光イメージングによる4T1細胞の生着率評価 (A)細胞注入法および(B)細胞シート移植法

(C)4T1由来腫瘍形成挙動の経日変化 細胞シート(○), 細胞懸濁液(●), PBS(□)

細胞懸濁液注入により作製した腫瘍組織は皮下組織のみに結合しているのに対し、細

胞シート法では皮下のみでなく筋層側まで浸潤した組織を形成することが明らかとなった。

KLN205 の系においては、細胞懸濁液注入群では、投与5日後に皮下に腫大が観察されたが、この腫大は徐々に縮小していった。この群のマウスにおける発光量は、移植後急激に減少し、移植5日後でPBS投与群とほとんど変わらない値となった。また、組織学的検討から、この腫大は炎症反応による肉芽組織に基づくものであることが明らかとなり、がん細胞はほとんど生着していないことが確認された。これに対して、細胞シート移植群では、移植後5日後程から、移植部位近傍に腫大が観察され、徐々に増大した。このマウスをIVISで測定したところ、発光強度は移植10日後まで減少傾向にあったが、移植14日後には、発光強度が増大した。腫瘍周辺部の組織を採取後、薄切切片を作製し、ヘマトキシリン・エオシン(HE)染色およびサイトケラチン5の免疫染色を行った結果、この腫大部には、核の異型が観察され、扁平上皮がんのマーカであるサイトケラチン5に陽性であることから、扁平上皮癌であることを確認した。このような移植方法による腫瘍形成能の相違の原因として、移植がん細胞の組織生着率の違いが考えられた。トリプシン処理によって回収した細胞では、酵素処理により細胞膜の接着タンパク質が分解されてしまい、移植した細胞が生着せずにほとんど排除されると推察される。これに対し、細胞シートは接着タンパク質が保持されており、移植後直ちに皮下に生着することができるため、移植効率が極めて高いと考えられる。ホスト組織との連結の結果、細胞増殖に必要な生体成分・酸素が供給され、腫瘍の増大が誘起されたものと考察される。

ホスト動物への移植時の免疫反応の影響について、免疫保持および免疫不全マウスを検討した結果、細胞懸濁液注入法では、移植後数日、移植部位で好中球を主とする免疫細胞の残存および強い炎症系サイトカインの発現が観察された。一方、細胞シート移植法は、細胞移植時の侵襲性が高いことから移植直後には炎症細胞が確認されるが、移植から3日経過するとほとんど炎症系細胞が観察されなくなり、徐々にがん細胞の増殖系遺伝子の発現が高くなっていくことがわかった。このように、細胞シート移植法は、がん細胞の組織生着性が細胞懸濁液移植法と比較して非常に高く、担がんモデルマウスを作成するのに有効であることが確認された。

一方、生体組織への効率的かつ定量的な細胞移植を実現するために、ゼラチン薄膜を支持体とする細胞シート移植法を開発した。この方法では、温度応答性培養皿上で培養した細胞上にゼラチン溶液を塗布し、温度低下により支持体となるゼラチンゲルを細胞表面に形成させる。温度低下時に、細胞基底膜と温度応答性培養皿の相互作用が低下するが、

ゼラチンゲル層の影響により細胞は浮遊・伸縮せず、培養皿上に伸展した状態で保持される。これにより細胞はゼラチンゲルとともに容易に剥離できるのみでなく、ゼラチンゲルの大きさを調整することにより移植する細胞数を規定でき、わずか数ミリ四方の細胞シートも容易にピンセット等を利用して培養皿から回収することが可能となった。さらに、ゼラチンゲルは体内で溶解することから、移植1日後にはゲルが崩壊し、貼付した生体組織表面に細胞シートのみを移植できることが明らかとなった。

上記の移植法を利用して、マウス肝がん由来細胞(BW1J)シートの肝表面貼付による肝臓内腫瘍形成能を検討した。マウス肝臓表面は中皮膜により組織保護されていることから、細胞死シートの移植が困難であった。このため肝臓表面の中皮膜を除去した後に移植を行った。具体的には、麻酔下のヌードマウスの皮膜をプルロニックゲルに埋包したトリプシンで除去処理し、トリプシン除去後に外側右葉表面に細胞シートを貼付した。次に移植部位を内側左葉、内側右葉で被覆後、肝臓を体内に戻し、閉腹した。移植1日後のマウス肝臓のHE染色を行ったところ、肝臓の葉間に移植したがん細胞のみが肝臓表面に層状に存在すること確認された。また、移植後の肝臓内の様子を小動物用のマイクロCTで確認したところ、移植後7日で肝臓内に腫瘍様の像が観察され、肝臓内全体で腫瘍が成長していく様子が確認された。特に、中皮膜を除去した肝臓では著しい腫瘍の形成が確認され、移植した全てのマウスで肝臓内に腫瘍を生着させることに成功した。またこのBW1J(C57L由来)を免疫保全のC57BL/6に移植する他家移植を行った。興味深いことにBW1Jは皮下移植では、一旦腫瘍を形成するがその後免疫作用により排除され長期に生着しなかった。しかしながら、肝臓内へ同所移植するとがん細胞は肝臓内で徐々に増殖し、移植後42日には非常に大きな腫瘍を形成できることが分かった。同様の方法でHuH7やHepG2などのヒト肝がん由来細胞も免疫不全マウスの肝臓内に生着させることにも成功し、細胞シートの肝表面移植法が肝臓内にがんを形成させるのに非常に有用な方法であることが確認された。一方、肝内腫瘍モデルと皮下腫瘍モデルを用いて、がん移植部位による抗がん剤の応答性の違いを検討した。ドキソルビシンを両モデルに投与したところ、皮下腫瘍では有意な抗腫瘍効果が観察されるのに対し、肝臓内の腫瘍ではほとんど抗腫瘍効果が発現されないのみでなく、肝機能低下による肝毒性の増加による副作用で生存率が低下する傾向が観察された。皮下腫瘍モデルでは肝臓は正常であることから抗がん剤の毒性が致命的にならないような場合でも、肝臓のような薬物代謝の中核となる機能を持つ臓器ではがんによる機能低下などが大きく影響したためと考えられる。

以上の結果より、細胞シート移植法は、効率的にがん細胞を移植可能であるだけでなく、高い腫瘍形成を実現することが明らかとなった。将来的には、大型動物の同所がん移植モデルの作製への応用は期待される。特に大型動物を用いることで、マウスなどのげっ歯類では移植が困難であった食道組織をはじめとする同所組織移植が可能になると考えられる。細胞シート移植法による担がんモデル動物作成技術を発展させることにより、有用な抗がん剤のスクリーニングシステム形成に寄与できると期待される。

一方、ヒト肝臓がん細胞株 (HLE) 由来細胞シートをI型コラーゲンで作製した薄膜ゲルでサンドイッチした生体がん模倣型の3次元組織モデルを構築した。ヒト肝臓がん細胞シートを2枚のコラーゲン薄状ゲル内にサンドイッチした生体がん模倣型の3次元構造体(高さ/径: 9.8mm/27mm)を構築した(図5)。ゲルに埋包された細胞シートはハイポキシア誘導因子 HIF- α の発現に確認されるように低酸素環境におかれていることが明らかとなった。これにより低酸素環境により誘導される VEGF 分泌量が通常に2次元培養系と比較して増加するなど生体内がんの微小環境に類似した状態を再現できることが明らかとなった。また、がん細胞シートを取り囲むコラーゲンゲルががん間質のように細胞の活発な増殖と低分子物質の拡散を制限し、通常の2次元培養系と比較してドキシソルピシンに対する薬物応答性が大きく低減することが分かった。以上の結果より、生体組織に近い構造と高生理活性を有するがん細胞シートを用いることで、*in vitro*においても生体模倣型の3次元がん組織モデルを構築し、抗がん剤などの薬物応答性を評価する新しいツールとしての応用が期待された。

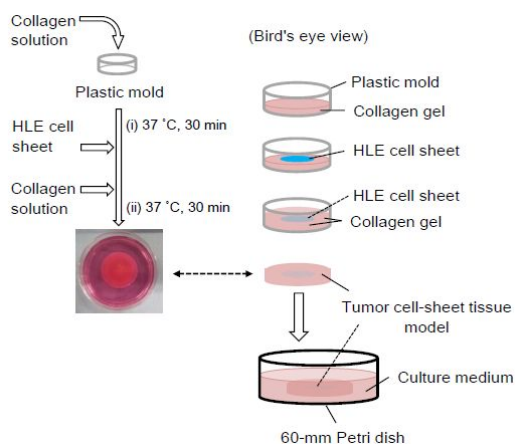


図5 コラーゲン薄膜ゲルサンドイッチ法を利用した生体模倣型3次元がん組織モデル

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計6件)

Akimoto Jun, Takagi Soichi, Nakayama

Masamichi, Arauchi Ayumi, Yamato Masayuki, Okano Teruo, Transplantation of cancerous cell sheets effectively generates tumor-bearing model mice, *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, 査読有, in press. DOI: 10.1002/term.1850

Iwase Yuko, Nakayama Masamichi, Yamato Masayuki, Okano Teruo, Bio-mimicking tumor tissue model using hepatocellular carcinoma cell-sheet in collagen sandwich system, *Anticancer Research*, 査読有, 35, 2015, 6481-6486.

<http://ar.iijournals.org/content/35/12/6481.full.pdf+html>

秋元 淳, 中山正道, 岡野光夫, 生体に学ぶ3次元がん組織モデルへのアプローチ, *バイオマテリアル*, 査読なし, 33, 2015, 236-245.

Akimoto Jun, Arauchi Ayumi, Nakayama Masamichi, Kanaya Ryo, Iwase Yuko, Takagi Soichi, Yamato Masayuki, Okano Teruo, Facile cell sheet manipulation and transplantation by using in situ gelation method, *J. Biomed. Mater. Res. B: Applied Biomaterials*, 査読有, 102B(8), 2014, 1659-1668.

DOI: 10.1002/jbm.b.33148

Akimoto Jun, Nakayama Masamichi, Okano Teruo, Temperature-responsive polymeric micelles for optimizing drug targeting to solid tumors, *J. Control. Release*, 査読有, 193, 2014, 2-8.

DOI:10.1016/j.jconrel.2014.06.062

Nakayama Masamichi, Akimoto Jun, Okano Teruo, Polymeric micelles with stimuli-triggering systems for advanced cancer drug targeting, *J. Drug Target.*, 査読有, 22(7), 2014, 584-599.

DOI:10.3109/1061186X.2014.936872

[学会発表](計13件)

Nagase Kenichi, Thermoresponsive polymer brushes for bioseparations, The 96th CSJ Annual Meeting, Asian International Symposium -Advanced Nanotechnology, Kyoto, Japan, 2016年3月25日, 同志社大学京田辺キャンパス(京都府京都市)

Nakayama Masamichi, Okano Teruo, Light-sensitive Fluoropolymer Coated Surfaces for Smart Cell Recovery System, BITs 2nd Annual World Congress of Smart Materials-2016, 2016年3月5日, Singapore

Nakayama Masamichi, Tomonori Kanno, Akihiko Kikuchi, Okano Teruo,

Photo-responsive Fluoropolymer Coated Surface for Cell Adhesion Control, 2015 年 8 月 31 日, Krakow (Poland)

Nakayama Masamichi, Akimoto Jun, Okano Teruo, Effective Fabrication of Tumor-bearing Animal Models by Cancer Cell Sheet Transplantation, 42nd CRS Annual Meeting & Exposition, 2015 年 7 月 27 日, Edinburgh (Scotland)

豊島佑樹, 中山正道, 菊池明彦, 大和雅之, 岡野光夫, 温度応答性高分子コーティング多孔性培養基材の作製と特性評価, 第 64 回高分子学会年次大会, 2015 年 5 月 28 日, 札幌市 (北海道)

Nakayama Masamichi, Kanno Tomonori, Kikuchi Akihiko, Okano Teruo, Light-responsive fluoropolymer coated surface for dynamic control of cell adhesion, 4th International Conference on Multifunctional, Hybrid and Nanomaterials, 2015 年 3 月 9 日, Sitges (Spain)

Nakayama Masamichi, Kimura Yurika, Kanazawa Hideko, Yamato Masayuki, Okano Teruo, Nano-scale surface coating of poly(N-isopropylacrylamide)-based block copolymers for cell sheet harvest, 15th IUMRS-International Conference in Asia, 2014 年 8 月 26 日, 福岡大学 (福岡県福岡市)

菅野智典, 中山正道, 菊池明彦, 岡野光夫, 光スイッチングにより細胞接着・脱着制御を実現する撥水性ポリマーコーティング表面の構築, 第 63 回高分子討論会, 2014 年 9 月 26 日, 長崎大学文教キャンパス (長崎県長崎市)

中山正道, 細胞シート工学の基礎研究と将来展望, 第 30 回日本 DDS 学会学術集会, 2014 年 7 月 31 日, 慶應義塾大学芝共立キャンパス (東京都港区)

中山正道, 岡野光夫, 温度応答性高分子材料を用いた DDS 研究へのアプローチ, 第 30 回日本 DDS 学会学術集会, 2014 年 7 月 30 日, 慶應義塾大学芝共立キャンパス (東京都港区)

Nakayama Masamichi, Kanno Tomonori, Matsuzaka Naoki, Takahashi Hironobu, Kikuchi Akihiko, Yamato Masayuki, Okano Teruo, End-functional Poly(N-isopropylacrylamide) brushes for efficiently promoting cell adhesion and detachment, Society For Biomaterials 2014 Annual Meeting & Exposition, 2014 年 4 月 18 日, Denver (USA)

Nakayama Masamichi, Matsuzaka Naoki, Takahashi Hironobu, Kikuchi Akihiko, Okano Teruo, End-functional

Poly(N-isopropylacrylamide) Brush Surfaces for Temperature-controlled Cell Adhesion Property, 25th European Conference on Biomaterials, 2013 年 9 月 10 日, Madrid (Spain)

Nakayama Masamichi, Kimura Yurika, Yamada Naoko, Kanazawa Hideko, Okano Teruo, Nano-scale Surface Coating of Thermoresponsive Block Copolymers for Thermally Regulating Cell Adhesion/Detachment Behavior, 40th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society, 2013 年 7 月 23 日, Honolulu (USA)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中山 正道 (NAKAYAMA Masamichi)
東京女子医科大学・医学部・講師
研究者番号: 00338980

(2) 研究分担者

長瀬 健一 (NAGASE Kenichi)
東京女子医科大学・医学部・講師
研究者番号: 10439838

秋元 淳 (AKIMOTO Jun)
東京女子医科大学・医学部・助教
研究者番号: 80649682

岩瀬由布子 (IWASE YUKO)
東京女子医科大学・医学部・博士研究員
研究者番号: 80406371

(3) 研究協力者

菅野智規 (KANNO Tomonori)
豊島佑樹 (TOYOSHIMA Yuki)