

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2014～2016

課題番号：26282138

研究課題名（和文）生体外での増殖・浸潤・転移挙動評価を可能とする革新的ヒト3次元腫瘍モデルの創製

研究課題名（英文）Fabrication of Innovative Human 3D-Tumor Models for In Vitro Evaluation of Cancer Growth, Invasion, and Metastasis

研究代表者

松崎 典弥 (Matsusaki, Michiya)

大阪大学・工学（系）研究科（研究院）・准教授

研究者番号：00419467

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 11,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、申請者が考案した、細胞表面に人工細胞外マトリックス（ECM）ナノ薄膜を形成することで細胞間接着を制御して三次元組織体を構築する「細胞集積法」を用い、腫瘍細胞に特徴的な「過増殖性」、「浸潤性」、「転移性」を再現できる三次元ヒト腫瘍モデルの構築を達成した。腫瘍細胞の毛細血管・リンパ管への浸潤を生体外で評価可能な3次元腫瘍組織モデルはこれまで報告例が無く、世界で初めての成果である。また、本腫瘍モデルを用いて抗癌剤の抗腫瘍効果を評価した結果、2次元培養より1000倍高い抵抗性の発現が確認された。さらに、患者由来の初代がん細胞の培養にも応用しており、創薬・医療分野へ多大なる貢献が期待される。

研究成果の概要（英文）：In this research, in vitro 3D-human tumor models, reflecting tumor growth, invasion, and metastasis, was constructed by cell accumulation technique via fabrication of nanometer-sized extracellular matrix films on cell surface. This is the first report in the world about 3D-tumor tissue models which allow in vitro evaluation of cancer cell invasion into blood and lymph capillaries. Furthermore, extremely high drug resistance approximately 1000 times against anticancer drugs was found in 3D-tissue models as compared to that in 2D-culture. Since the 3D-models are now applying primary culture of patient's cancer cells, it is expected to apply in pharmaceutical and medical fields.

研究分野：生体材料

キーワード：組織工学 再生医療 三次元腫瘍モデル 脈管構造 薬物評価

### 1. 研究開始当初の背景

山中教授によるヒト人工多能性幹 (iPS) 細胞の樹立により、iPS 細胞の再生医療や創薬・化粧品分野の効果・毒性判定への応用が期待されている。これらの応用を実現化するためには、生体外でヒト組織に類似した三次元組織体を構築する必要があるが、iPS 細胞技術だけでは不可能である。つまり、iPS 細胞技術とは別に、様々なヒト細胞を三次元的に組織化する「三次元組織構築技術」の確立が求められている。米国では、既に、ハーバード大学 Wyss Institute にアメリカ食品医薬品局 (FDA) と国立衛生研究所 (NIH) の巨額の研究費が投じられ、「Organ on a chip」という、動物実験に代わるヒト細胞のチップを用いた医薬品評価を実現するプロジェクトが進行している (D. E. Ingber et al., *Science* **328**, 1662 (2010))。iPS 細胞で優位に立った日本がそのリードを維持して激しい国際競争に勝つためには、国際競争力に優れた普遍性の高い三次元組織構築技術の確立が急務である。

厚生労働省の平成 23 年度人口動態統計月報年計によると、癌および悪性腫瘍 (悪性新生物) は昭和 56 年より死因の第一位を維持し続け、平成 23 年の統計でも 28.5% と増加の一途をたどっている。他の疾患と比較して有効な治療法の開発が困難な理由として、効果的な動物腫瘍モデルが少ないことやヒトと動物の種差の影響があげられる。これまで、様々な手法により生体外での三次元ヒト腫瘍モデルの構築が検討されてきた。しかし、そのほとんどは凝集体であるスフェロイドを用いた報告であり、腫瘍組織の形成と浸潤・転移機能に重要な毛細血管・リンパ管網構造を有しておらず、生体の腫瘍組織とは構造および機能の面でかけ離れていた (H. Dolznig et al., *Drug Discov. Today* **8**, 113 (2011))。従って、毛細血管・リンパ管網を有し、腫瘍細胞に特徴的な「過増殖性」、「浸潤性」、「転移性」を再現できる三次元ヒト腫瘍モデルを構築できれば、新たな抗がん剤や治療法の開発への多大なる貢献が期待される。

申請者は、細胞膜表面のマイクロ環境を制御し、機能発現に重要な役割を果たしている細胞外マトリックス (ECM) に着目し、ナノ薄膜による細胞界面の制御と三次元組織体を構築する革新的手法を考案した。具体的には、細胞膜表面に数 nm ~ 数十 nm のナノ ECM 薄膜を形成する手法である。これまで、フィブロネクチン (FN) - ゼラチン (G) 薄膜を細胞表面にわずか 6 nm 形成することで、細胞間の接着を誘起し、複数種類の細胞で構成される三次元組織体の構築を初めて実現した (「細胞積層法」, (*Angew. Chem. Int. Ed.* **46**, 4689 (2007) (IF2012=13.734))。また、本手法を改善し、粒子状態の細胞表面へ FN-G ナノ薄膜を形成して細胞間接着を三次元的に誘導することで、わずか 1 日で 20 層以上 (>100 μm) の三次元組織構築を達成した (「細胞集積法」, A. Nishiguchi et al., *Adv. Mater.* **23**, 3506

(2011) (IF2011=14.829))。ヒト血管内皮細胞やリンパ管内皮細胞をサンドイッチ培養することで 3 次元毛細血管・リンパ管構造の構築にも成功した。

### 2. 研究の目的

本研究では、細胞積層・集積法を応用し、「生体外で増殖・浸潤・転移挙動を評価可能な革新的ヒト 3 次元腫瘍モデルの創製」を目的とした。本研究により、腫瘍細胞に特徴的な過増殖性、浸潤性、転移性を生体外で評価することが可能となり、抗がん剤やドラッグデリバリーシステム (DDS) の抗腫瘍効果を経時的かつ定量的に解析できれば、実験動物に代わり、ヒトへの薬効、安全性、毒性、薬物動態を迅速に評価可能な革新的な創薬デバイスとなること期待され、創薬や医療産業の活性化に貢献できる。さらに、特許期限切れ薬剤の癌治療への新たな治療効果のスクリーニング評価への応用や、基礎医学、生理学分野、病理学分野の発展への貢献も期待される。

### 3. 研究の方法

本研究では、腫瘍細胞の増殖と浸潤、転移挙動を生体外で評価可能なヒト 3 次元腫瘍モデルの創製を目的としているため、「生体外でのモデルを用いた実験」と「免疫不全マウスを用いた動物実験」を並行して行い、得られた結果を組織学的、生物学的、化学的観点から多角的に比較検討する。これにより、本腫瘍モデルと動物実験の相違点を整理して明らかにすることが可能となる。さらに、実際の創薬・医療分野への応用を目的として、抗癌剤の薬効評価や DDS 療法の効果判定についても同様に動物実験と比較検討することで、実際の医薬品評価にどこまで適用できるか明らかにする。

本研究は大別して、i) 増殖・浸潤・転移腫瘍モデルの構築と ii) 各腫瘍モデルと実験動物モデルの比較検討、iii) 腫瘍モデルを用いた抗腫瘍効果の生体外評価への応用の 3 項目から構成される。具体的な研究計画は以下のとおりである。

#### i) 増殖・浸潤・転移腫瘍モデルの構築

毛細血管網や毛細リンパ管網を有する 3 次元線維芽細胞組織体に腫瘍細胞を播種し、その増殖および浸潤過程を経時的かつ定量的に評価する。本手法で構築した線維芽細胞組織体は、豊富な毛細血管と線維芽細胞で構成されるため、組織学的に創傷治癒組織に類似している。従って、創傷治癒組織へ腫瘍細胞が生着して発生する「癌性腹膜炎」のモデルとしての応用を想定し、実際に腹膜への転移が知られている膵癌や胃癌、結腸癌細胞などを用いる。

具体的には、各腫瘍細胞の線維芽細胞組織体への接着と増殖、浸潤を経時的かつ定量的に評価し、腫瘍細胞数の変化に対する血管内

皮細胞やリンパ管内皮細胞、線維芽細胞数の変化の関係を明らかにする。また、腫瘍細胞の増殖・浸潤に対する血管・リンパ管網の密度や形態、3次元分布の変化を解析する。さらに、血管やリンパ管への腫瘍細胞の浸潤と転移(移動)挙動を評価することで、転移モデルとしての可能性を明らかにする。

#### ii) 各腫瘍モデルと実験動物モデルの比較検討

癌性腹膜炎の生体外モデルとしての有効性を示すためには、動物実験を用いた生体内での癌性腹膜炎の挙動との比較検討が重要となる。そこで、免疫不全マウスの腹膜に人為的に傷をつけて創傷治癒部を作製し、同じ癌細胞を移植後、生体外モデルと同じ培養期間における腫瘍組織の変化を組織学的に解析する。その結果を生体外モデルの結果と詳細に比較して、類似性と非類似性を整理することで、生体外モデルとしての適用範囲が明確化できると期待される。

#### iii) 腫瘍モデルを用いた抗腫瘍効果の生体外評価への応用

ii)で得られた結果を基に、抗癌剤や DDS の抗腫瘍効果の生体外評価への可能性を検証する。薬剤の拡散や腫瘍組織への集積、DDS キャリア粒子からの薬剤徐放性と腫瘍組織の体積・死細胞数変化を評価し、動物実験と比較することで、生体外評価への応用の可能性を明らかにする。

### 4. 研究成果

項目 i)では、「腫瘍細胞の増殖・浸潤性と周辺細胞への影響評価」として癌性腹膜炎モデルとしての可能性を評価した。具体的には、癌性腹膜炎を引き起こす膵がん細胞と結腸がん細胞を用い、3次元線維芽細胞組織体の表面へ接着させ、その後の挙動を経時的かつ定量的に解析した。その結果、がん細胞の性質に応じて異なる浸潤挙動が観察された。血行性転移性の膵がん細胞は、毛細血管網へ侵入して移動する血行性転移類似の挙動が観察された。また、リンパ行性転移の膵がん細胞では、血管網に対してはアポトーシスを誘導したが、毛細リンパ管には侵入するリンパ行性転移類似の挙動を示した。膵がん細胞の性質に応じた血行性・リンパ行性転移の生体外での再現は、世界で初めての報告である。

さらに、同じがん細胞で転移性を加速した高転移株を用いて同様の実験を行った。マウスへの移植を8回繰り返して転移性の高い細胞のみを株化した舌癌高転移株と通常の舌癌を比較すると、高転移株で優位にリンパ管へ接近・侵入する挙動が観察された。これは、同じ株由来のがん細胞でも転移性の異なるがん細胞の性質の違いを *in vitro* で再現できることを示しており、極めて重要な知見である。

項目 ii)では、「免疫不全マウスへの腫瘍細胞

の移植実験」として、項目 i)と同じがん細胞を免疫不全マウスの腹膜に移植した。マウスの腹部の一部を開腹し、人為的に創傷部を作製して閉腹した。一日後に創傷部へがん細胞を移植して生着させた。初期的な挙動を明らかにする目的で、1週間までの経過を病理学的に評価した。抗サイトケラチン抗体を用いたがん細胞の免疫染色より、腫瘍組織の形態とサイズを組織学的かつ定量的に解析した。抗 CD31 抗体による毛細血管の免疫染色より、腫瘍組織内部と周辺の創傷治癒部における毛細血管数を定量評価した。また、抗 CD31 抗体の免疫染色で腫瘍細胞の血管数への影響が観察された。さらに、生体外での浸潤・転移実験の結果と動物実験の結果を比較したところ、がん細胞の浸潤と脈管への影響に相関がみられた。

項目 iii)として、まず、膵がん細胞の毛細血管へのアポトーシス誘導メカニズムを解明するため、マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) の発現を網羅的に解析した。その結果、組織体への浸潤開始期とアポトーシス誘導期、血管への侵入期で、それぞれ発現する MMP の種類が異なることを確認した。がん細胞の侵入過程で MMP の発現の違いを経時的かつ定量的に解析することは、動物実験では困難であるため、本 *in vitro* モデルの有用性が示された。また、血行性転移株の膵がん細胞や結腸がん細胞に関しても同様の網羅解析を行った結果、やはり浸潤過程で産生する MMP の種類が異なることが明らかになった。

さらに、抗がん剤ゲムシタピンをを用いた抗腫瘍効果の薬効試験を行ったところ、2次元培養と比較して3次元培養では、約1000倍高い薬剤抵抗性が発現することが明らかとなった。この結果は、薬効・毒性試験での3次元培養系の重要性を示している。

現在、癌研有明病院と共同研究を開始し、患者由来の初代がん細胞の培養と個別化医療への応用を検討中である。

以上より、本3次元がんモデルは、動物実験と類似の傾向を評価できる生体外モデルとして有用であることを見出した。計画通り研究を推進できただけでなく、患者由来の初代がん細胞を用いた研究まで発展できたため、当初の予想以上の成果を得ることができた。

### 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25件)10件を抜粋

1. Michiya Matsusaki, Misaki Komeda, Simona Mura, Hiroyoshi Tanaka, Mitsunobu R. Kano, Patrick Couvreur, and Mitsuru Akashi, Desmoplastic Reaction in 3D-Pancreatic Cancer Tissues Suppresses Molecular Permeability, *Adv. Healthcare*

- Mater.*, *accepted*. (March 7, 2017).
2. V. Gribova, C.-Y. Liu, A. Nishiguchi, **M. Matsusaki**, T. Boudou, C. Picart, M. Akashi, Construction and Myogenic Differentiation of 3D Myoblast Tissues Fabricated by Fibronectin-Gelatin Nanofilm Coating, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **474**, 515-521 (2016).
  3. D. Hikimoto, A. Nishiguchi, **M. Matsusaki**, M. Akashi, High-Throughput Blood- and Lymph-Capillaries with Open-Ended Pores which allow the Transport of Drugs and Cells, *Adv. Healthcare Mater.* **5**, 1969-1978 (2016).
  4. C. Y. Liu, **M. Matsusaki**, M. Akashi, Control of Vascular Network Location in Millimeter-sized 3D-Tissues by Micrometer-sized Collagen Coated Cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **472**, 131-136 (2016).
  5. P. Chetprayoon, **M. Matsusaki**, U. Yokoyama, T. Tejima, Y. Ishikawa, M. Akashi, Use of Three-dimensional Arterial Models To Predict the In Vivo Behavior of Nanoparticles for Drug Delivery, *Angew. Chem. Int. Ed.* **55**, 4461-4466 (2016).
  6. Y. Amano, A. Nishiguchi, **M. Matsusaki**, H. Iseoka, S. Miyagawa, Y. Sawa, M. Seo, T. Yamaguchi, M. Akashi, Development of Vascularized iPSC Derived 3D-Cardiac Myoblast Tissues by Filtration Layer-by-Layer Technique and Their Application for Pharmaceutical Assays, *Acta Biomater.* **33**, 110-121 (2016).
  7. A. Nishiguchi, **M. Matsusaki**, M. Akashi, Structural and Viscoelastic Properties of Layer-by-Layer ECM Nanofilms and to Their Interactions with Living Cells, *ACS Biomater. Sci. Eng.* **1**, 816-824 (2015).
  8. A. Nishiguchi, **M. Matsusaki**, M. Akashi, Harvesting Functional 3D-Engineered Tissues by Dynamic Wettability Control at Nano-Interfaces, *Adv. Healthcare Mater.* **4**, 1164-1168 (2015).
  9. P. Chetprayoon, F. Shima, **M. Matsusaki**, **T. Akagi**, M. Akashi, Sustainable Release of Paclitaxel from Biodegradable Poly( $\gamma$ -glutamic acid) Nanoparticles for Treatment of Atherosclerosis, *Chem. Lett.*, **43**, 1767-1769 (2014).
  10. **M. Matsusaki**, C. P. Case, M. Akashi, Three-dimensional Cell Culture Technique and Pathophysiology, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **74**, 95-103 (2014).

[学会発表](計 63 件) 10 件を抜粋

1. 【招待講演】松崎典弥、細胞外微小環境制御による 3 次元組織モデルの構築と薬剤評価への応用、第 16 回日本再生医療学会総会、2017 年 3 月 8 日、仙台国際セ

ンター

2. 【招待講演】松崎典弥、明石 満、細胞の立体造形技術、第 19 回日本小児心血管分子医学研究会、2016 年 7 月 6 日、東京ドームホテル
3. 【招待講演】**M. Matsusaki** and M. Akashi, Control of Cell Surfaces by Polymer/Protein LbL Films for Fabrication of 3D-Human Tissue Models, PCT2015, June 18-19, 2015, Bangkok, Thailand.
4. 【招待講演】**M. Matsusaki** and M. Akashi, Control of Cell Surfaces by LbL Films for Fabrication of 3D-Human Tissue Models, 4<sup>th</sup> International Conference “Strategy in Tissue Engineering”, June 10-12, 2015 Wuerzburg, Germany.
5. 【招待講演】**M. Matsusaki** and M. Akashi, Artificial 3D-Blood and Lymphatic Network Tissue Models Induce Cnace Metastasis, 2<sup>nd</sup> Tissue Models & Drug Screening Conference, May 5-6, 2015, Berlin, Germany.
6. 【招待講演】**M. Matsusaki** and M. Akashi, 3D-Human Tissue Models for Drug Assessments and Regenerative Medicine, Nanotech, June 17, June 17, 2015, Bangkok Thailand.
7. 【招待講演】**M. Matsusaki** and M. Akashi, Cell Surface Engineering Using Polymer/Protein Nanofilms for Tissue Engineering, IUMRS-ICAM2015, Oct. 25-29, 2015, Jeju Island, Korea.
8. 【招待講演】松崎典弥、明石 満、組織構築におけるナノバイオ技術、文部科学省 GRENE 事業ナノバイオコース、2015 年 2 月 16 日、東京工業大学田町キャンパス
9. 【招待講演】松崎典弥、明石 満、三次元ヒト生体組織モデルの構築と医療・創薬分野への応用、第 54 回関西バイオポリマー研究会、2015 年 2 月 10 日、京都工芸繊維大学
10. 【招待講演】松崎典弥、明石 満、細胞表面への高分子ナノ薄膜形成と三次元生体組織モデルの構築、第 19 回関西大学先端科学技術シンポジウム、2015 年 1 月 23 日、関西大学

[図書](計 18 件) 10 件を抜粋

1. **M. Matsusaki** and M. Akashi, In Vitro Design of Nanoparticles Using an Artificial 3D-Blood Vessel Wall Models for Atherosclerosis Treatment, ACS Book on Advances in Bioinspired and Biomedical Materials, ACS, *in press*.
2. **M. Matsusaki**, A. Nishiguchi, C.-Y. Liu, M. Akashi, Chapter I-3 Construction of Three-Dimensional Tissues with Capillary Networks by Coating of Nanometer- or Micrometer-Sized Film on Cell Surfaces,

Bioinspired Materials Science and Engineering, Wiley, *in press*.

3. 松崎典弥, 明石 満, 4.2 インクジェット交互積層 (LbL) 法による多機能性3次元皮膚モデル, 3次元細胞システム設計論, コロナ社, 2, 196-208 (2016). ISBN: 978-4-339-07262-4
4. 松崎典弥, 明石 満, 第 III 編 第 3 章 立体心筋組織体の創製, バイオ・医療への3Dプリンティング技術の開発最前線, シーエムシーリサーチ出版, 167-181, (2016). ISBN978-4-904482-32-2
5. 松崎典弥, 3D細胞プリンター, 日本印刷学会誌, 日本印刷学会, 53(4), 254-260 (2016).
6. 浅野義哉, 松崎典弥, 岡野大輔, 西口昭広, 明石満, 下田浩, 細胞集積法によるヒト人工三次元脈管組織のエンジニアリングと移植, リンパ学, 39(1) 18-20 (2016).
7. 松崎典弥, 日本バイオマテリアル学会第8回関西若手研究発表会, バイオマテリアル - 生体材料 -, 日本バイオマテリアル学会, 32(1), 51 (2014).
8. 松崎典弥, 明石 満, 生体高分子薄膜を用いた細胞表面の修飾による三次元組織体の構築, 化学と教育, 62(2), 64-67 (2014).
9. 松崎典弥, 明石 満, 生体高分子薄膜による細胞表面の機能制御と三次元組織体の構築, 表面, 広信社, 51(4), 159-169 (2014).
10. 西口昭広, 松崎典弥, 明石 満, Layer by Layer 細胞コーティング法 ~ マテリアル技術からのアプローチ ~, バイオインダストリー, シーエムシー出版, 31(1), 28-36 (2014).

〔産業財産権〕

出願状況 (計 15 件) 5 件を抜粋

名称: 三次元組織体及びその製造方法、並びに、三次元組織体の形成剤  
発明者: 松崎典弥・入江新司・北野史朗  
権利者: 国立大学法人大阪大学・凸版印刷株式会社  
種類: 発明  
番号: 特願 2017-015958  
出願年月日: 2017 年 1 月 31 日  
国内外の別: 国内

名称: 立体的細胞組織の製造方法  
発明者: 松崎典弥・入江新司・北野史朗  
権利者: 国立大学法人大阪大学・凸版印刷株式会社  
種類: 発明  
番号: 特願 2016-030916  
出願年月日: 2016 年 2 月 22 日  
国内外の別: 国内

名称: 脈管系構造を有する三次元組織の製造方法、および脈管系構造のゲルを含む三次元組織

発明者: 松崎典弥  
権利者: 国立大学法人大阪大学  
種類: 発明  
番号: 特願 2016-027196  
出願年月日: 2016 年 2 月 16 日  
国内外の別: 国内

名称: 人工組織及びその製造方法  
発明者: 明石 満・松崎典弥・海野倫明・坂田直昭・吉松軍平  
権利者: 国立大学法人大阪大学・国立大学法人東北大学  
種類: 発明  
番号: 特願 2014-248292  
出願年月日: 2014 年 12 月 8 日  
国内外の別: 国内

名称: 被覆細胞、その製造方法及び被覆細胞を用いた三次元組織体の製造方法  
発明者: 明石 満・松崎典弥・高村 寧  
権利者: 国立大学法人大阪大学  
種類: 発明  
番号: 特願 2014-169699  
出願年月日: 2014 年 8 月 22 日  
国内外の別: 国内

取得状況 (計 3 件)

名称: 腫瘍組織モデルの製造方法  
発明者: 明石 満・松崎典弥・宮園浩平・狩野光伸・細谷仁美・片岡一則・オラシオ アマデオ カブラル ロレンゾ・伊地知 秀明  
権利者: 国立大学法人大阪大学  
種類: 発明  
番号: 特許第 5884218 号  
取得年月日: 2016 年 2 月 19 日  
国内外の別: 国内

名称: 細胞の三次元構造体、及び、これを製造する方法  
発明者: 明石 満・松崎典弥・佐倉武司  
権利者: 国立大学法人大阪大学・住友ベークライト株式会社  
種類: 発明  
番号: 特許第 5850419 号  
取得年月日: 2015 年 12 月 11 日  
国内外の別: 国内

名称: 人工皮膚モデルの製造方法、及び人工皮膚モデル  
発明者: 明石 満・松崎典弥・佐倉武司・橋本公二・白方裕司・平川聡史  
権利者: 国立大学法人大阪大学・住友ベークライト株式会社・国立大学法人愛媛大学  
種類: 発明  
番号: 特許第 5920749 号  
取得年月日: 2016 年 4 月 22 日

国内外の別：国内

〔その他〕

・ホームページ

<http://www.chem.eng.osaka-u.ac.jp/~akashi-lab/>

・「対談：人間の可能性を信じる挑戦」CROSS TALK, 特集：難病の克服を目指す, 2017年3月17日, テレスコープマガジン 13号

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

松崎 典弥 (MATSUSAKI, Michiya)

大阪大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：00419467

##### (2)研究分担者

赤木 隆美 (AKAGI, Takami)

大阪大学・大学院生命機能研究科・特任准教授

授

研究者番号：00527236

##### (3)連携研究者

狩野 光伸 (KANO, Mitsunobu)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：80447383