

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870166

研究課題名(和文) Establishing the Design Principles to Control the Directional Cell Motility on Material Surface Topographies

研究課題名(英文) Establishing the Design Principles to Control the Directional Cell Motility on Material Surface Topographies

研究代表者

久代 京一郎 (Kushiro, Keiichiro)

東京大学・工学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：90632539

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：転移の際に癌細胞は体内の様々な微小構造中を移動するが、これら構造による影響やそのメカニズム等は解明されていない。代表者の先行研究で、マイクロ溝構造で正常上皮細胞の移動性が高まる「トポグラフィック効果」が報告された。今回そのトポグラフィック効果を利用し、癌細胞の移動を向上・制御できるのかを調べた。結果として、様々な癌細胞が正常細胞と比べ、細胞骨格の形成が安定に行えないため、トポグラフィックによる影響を受けにくいことが分かった。これは癌転移に関わる重要な発見であり、体内の微小構造のシグナルを無視することで、どのような場所にも登ったり潜り込んだりすることで、免疫細胞等から逃れている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：During metastasis, cancer cells migrate through various microstructures in the body, but the mechanical influence of these structures or the underlying mechanism have not been clarified. From previous works of the representative, it was shown that microgroove structures can enhance the motility of normal epithelial cells. Here, the possibility of controlling the migration of cancer cells using such "topography effect" was investigated. It was found that various cancer cells are unable to form stable cytoskeleton, and thus receive less topographical cues, resulting in interesting behaviors of cancer cells, such as the climbing of cancerous cells over the walls, which was not seen for normal cells. These observations are important discoveries in the context of cancer metastasis because they suggest that cancer cells can ignore the mechanical signals from the microstructures within the body and migrate to any part of the body, possibly facilitating their escape from immune cells.

研究分野：細胞移動・マイクロデバイス・細胞工学・バイオマテリアル

キーワード：マイクロトポグラフィック ハイドロゲル 細胞移動 癌

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、材料表面のマイクロ構造（トポグラフィー）を駆使して、細胞挙動（移動、増殖、分化等）を制御する研究が注目されている。研究代表者の先行研究では、二次元のマイクロパターンを利用し細胞方向性移動をコントロールすることに成功したが [1,2]、これらがより重要かつ生理学的にもより相応しい三次元システムでも引き起こされるのかは確認されていなかった。そこで、本研究では、これまで二次元で細胞移動をコントロールできていた各種マイクロパターンをマイクロ流路システム用に改造し、これを達成しようと考えていた。このような、勾配や流体の流れを必要としない構造のみの細胞移動誘導には、従来の化学勾配等と比べ、様々な利点や用途があり、再生医療用の足場材料や細胞分離デバイス等の開発にもつながると思われる。また、転移の際に癌細胞は体内の様々なマイクロ構造中を移動するが、これら構造による影響やそのメカニズム等は解明されていない。癌細胞の移動に作用するような構造体を作成・分析することで、癌の転移メカニズムの新たな知見に繋がると思われる。

2. 研究の目的

(1) 本研究の当初の目的では細胞の様々な挙動を、単なる二次元マイクロパターンではなく、三次元の非対称なマイクロ流路を用い、三次元構造が細胞挙動、特に細胞方向性移動、に与える影響を調べることを一つの目的としていた。

(2) また、今回の研究では、構造体に対する細胞移動の変化を正常細胞および癌細胞で比べることも目的としていた。異なる材料・表面・構造特性を有するマイクロトポグラフィーを作製し、その基板上で様々な細胞の移動性や形態の変化を測定・解析すること

で、三次元構造体が細胞に与える機械的伝達シグナル等の影響を理解しようと試みた。そうすることで、自然界で起きるトポグラフィー依存の細胞移動現象（例：癌転移、創傷治癒）を理解するだけでなく、細胞移動をコントロール・診断できる構造を駆使した新たな機能性生体材料・デバイスの創製を目指す。

3. 研究の方法

(1) 基板の作成方法

Tetra-(polyethylene glycol) (Tetra-PEG) ハイドロゲルを使用し、三次元溝構造体を作製した。Tetra-PEG ハイドロゲルの利点としては、優れた物質透過性、透明性、生態適合性等があげられ、さらには体内組織と類似した弾性率および高い均一性が得られるため、癌の転移モデルの材料としても適している。大半の実験は天井の無い溝構造を用いたが、マイクロ流路を形成するには、未反応部位（チオール基やマレイミド基）を残したハイドロゲル溝構造と平らな基板を張り合わせた。溝構造は PDMS やニッケルの鋳型で Tetra-PEG ハイドロゲルの型を取り、細胞接着因子の一つである RGDC ペプチド 1mg/mL で表面コーティングした。物性や手順の詳細は論文にて発表されている [3]。

(2) 細胞の移動性測定及び免疫染色

本実験では様々な正常および癌細胞を使用した。主に使用された細胞は、ヒト乳腺上皮細胞 MCF-10A、ヒト乳癌上皮細胞 MCF-7、ヒト前立腺上皮細胞 RWPE1、ヒト前立腺癌上皮細胞 RWPE2 および PC3 である。これらの細胞を様々な溝構造基板に播種し、インキュベーター付き顕微鏡 (AZTEC 社) で細胞移動性測定 (スピードや持続長) を約 24 時間行った。アクチン繊維や接着班分子のヴィンキュリン、パキシリン等の免疫染色はホルマリンやトリトーン X 等を使った標準的なプロトコルを使った。

4. 研究成果

(1) マイクロトポグラフィーによる各種細胞移動の変化

前回の研究成果[4]から、正常上皮細胞は平坦な基板では普通のランダム移動を行うが、三次元溝構造の壁際では細胞の移動性が劇的に高まり、スピードや持続長が平坦な基板と比べ約3倍以上にも膨れ上がることが分かった(図1、MCF-10A)。さらに、形態も細胞移動に特化したコンパクトなものに変化し、アクチン繊維が収束・平行化することで、つまりは膜状仮足が同じ方向に伸びることで、スピードや持続性が高まる事が示唆された。今回様々な正常・癌細胞の溝構造での移動性を調べた結果、全ての細胞において、移動速度・持続性が、平坦な表面と比べ、高まることが分かった(図1)。この表面構造による移動性の向上を、以降トポグラフィー効果と呼ぶ。興味深いことに、癌細胞へのトポグラフィー効果は正常細胞と比べ低下した。特に持続性に関しては、対応する正常細胞と比べ、トポグラフィー効果による増加量が1割以下の場合も見られた(例：MCF-10A とMCF-7)。

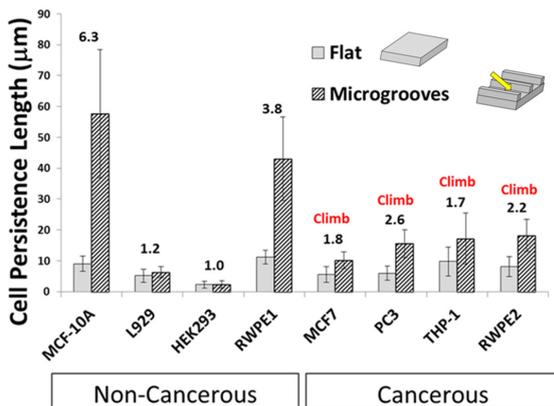


図1 正常細胞(左側)と癌細胞(右側)の溝構造の壁および平坦な表面での移動性(持続性のみ表示)の定量的。バー上の数字は構造体に面した場合と平坦な表面での移動性の比を示す、トポグラフィー効果の指標である。また、「Climb」の表示は、細胞が溝構造の40ミクロンの壁を登れることを示す。

(2) 癌細胞特有の移動挙動

実際の細胞移動の挙動を観察すると、正常細胞は溝構造の壁に面した際に一方方向に壁をつたって移動する。対して癌細胞は、構造体に面しても、方向転換を頻繁に行い、壁から離脱することも多々見られた(図2)。

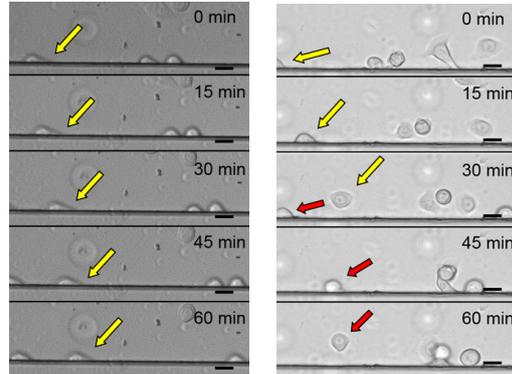


図2 溝構造での正常RWPE1細胞の移動挙動(左)および癌RWPE2細胞の移動挙動(右)を表すタイムラプス画像。矢印は注目すべき細胞の位置を示す。スケール：20ミクロン。

さらに、癌細胞のみ40ミクロンの壁を有する構造体を登ることが確認された。登る速度や頻度は様々であったが、乳癌上皮細胞、前立腺癌上皮細胞、白血病由来のマクロファージ等が、自身の倍以上の高さの壁を垂直に登れることが確認された(図3)。

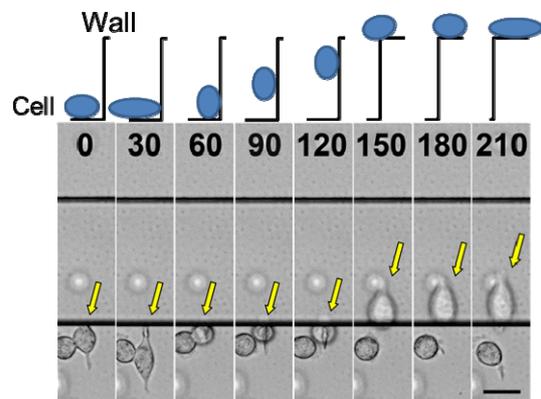


図3 PC3細胞が溝構造を垂直に登る様子を表すタイムラプス画像。矢印は注目すべき細胞の位置を示す。数字は撮影経過時間を分で表す。スケール：20ミクロン。

(3) 免疫染色による細胞移動の違いのメカニズム解析

上記の正常および癌細胞の移動性の違いとなる機械的シグナル伝達メカニズムを調べるために免疫染色を行った(図4)。細胞骨格のアクチン繊維や細胞と基板が接着する部位(焦点接着)に集まるヴィンキュリンの免疫染色により、正常細胞と癌細胞の移動形態に違いがあることが分かった。平坦な表面でも、正常細胞は極性化しており、方向性のある移動形態をとるが、癌細胞は比較的全方向に膜状仮足を展開した(図4 a, c)。この違いは溝構造に面した際により顕著になり、正常上皮細胞は前回見られた細胞形態[4]のように、一方向に壁と並行して伸びるアクチン繊維や少ない焦点接着が観察された。対して、癌細胞は壁に面しても、アクチン繊維を安定に並行化することができず、やはり様々な方向に膜を伸ばしていることが観察された(図4 b, d)。つまり、正常細胞がアクチン繊維を、壁の機械的刺激に対して、並行化する事で、一方向に移動性を高めているのに対し、癌細胞は機械的シグナルに応答せず、様々な方向に仮足を伸ばすからトポグラフィ効果による向上率が大幅に減少していると思われる。また、壁を登るといふ癌特有の現象もこれが理由だと思われる。

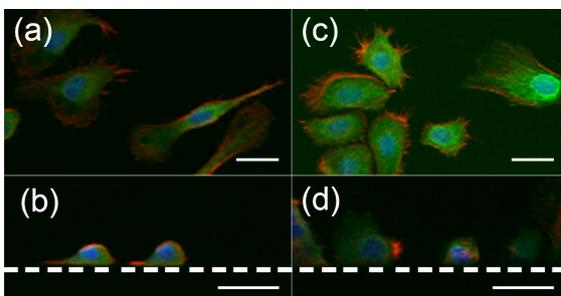


図3 正常RWPE1細胞(a, b)および癌RWPE2細胞(c, d)の平坦な表面(a, c)と溝構造(b, d)上での免疫染色画像。赤がアクチン繊維、青が核、緑がヴィンキュリンである。点線は溝構造の壁際であることを示す。スケール：20ミクロン。

これらの結果から、一般的に癌細胞が正常細胞と比べ、細胞骨格の形成が安定に行えないため、トポグラフィによる影響を受けにくいことが分かった。これは癌転移に関わる重要な発見であり、体内の微小構造のシグナルを無視することで、どのような場所にも登ったり潜り込んだりすることで、免疫細胞等から逃れている可能性が示唆された。

(4) 非対称壁構造の作成および効果・今後の課題

当初の目的である細胞方向コントロールを非対称な壁構造(例：ジグザグ壁構造)で試みたが、様々な細胞で方向性が効果的に制御された例は無かった。一つの問題点として、ハイドロゲルの膨潤があげられる。膨潤が起ると精密な構造が失われるため(図5)、パターン化構造の機械的シグナルが伝達されにくくなり、細胞の反応も普通の壁とあまり大差ないものとなっていると予想される。現在、非膨潤型のハイドロゲルの合成および物性の最適化を行っており、今後精密に非対称構造が作成でき、これによる細胞の方向性移動制御が実現できると期待される。

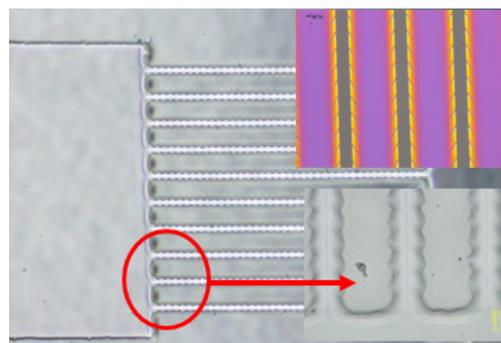


図5 非対称なジグザグ壁構造の膨潤した様子。右上のパネルが元となるマスクのパターンであり、右下のパネルが膨潤した構造の拡大図である。

注：上記の一部研究成果は現在 PNAS のジャーナルで査読が進行中である。

<引用文献>

[1] K. Kushiro, et al., Modular Design of Micropattern Geometry Achieves Combinatorial Enhancements in Cell Motility. *Langmuir*, 28(9): 4357-4362 (2012).

[2] K. Kushiro, et al., Reprogramming directional cell motility by tuning micropattern features and cellular signals. *Advanced Materials*, 22:4516-4519 (2010).

[3] K. Kushiro, et al., Slope-Dependent Cell Motility Enhancements at the Walls of PEG-Hydrogel Microgroove Structures. *Langmuir*, 31:10215-10222 (2015).

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4件)

①Kamata H, Kushiro K, Takai M, Chung U, Sakai T (2016). 'Non-Osmotic' Hydrogels: a Rational Strategy for Safely Degradable Hydrogels. *Angewandte Chemie (Communication)*. *In press*.

[学術論文、査読在]

②Kushiro K, Sakai T, Takai M (2015). Slope-Dependent Cell Motility Enhancements at the Walls of PEG-Hydrogel Microgroove Structures.

Langmuir. 31(37):10215-10222.

[学術論文、査読在]

DOI: 10.1021/acs.langmuir.5b02511.

③Hiraguchi Y, Nagahashi K, Shibayama T, Hayashi T, Yano T, Kushiro K, Takai M (2014). Effect of the distribution of adsorbed proteins on cellular adhesion behaviors using surfaces of nanoscale phase-reversed amphiphilic block copolymers.

Acta Biomaterialia. 10(7): 2988-2995.

[学術論文、査読在]

DOI:10.1016/j.actbio.2014.03.019

④Kushiro K, Ryo A, Takai M (2015). Using Microgroove Topography to Distinguish Non-Cancerous and Cancerous Cell Types through Differences in Directional Cell Motility. *MicroTAS 2015 19th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences*. 1:633-635.

[学会雑誌、査読無]

http://www.rsc.org/images/LOC/2015/PDFs/Papers/0683_W.123b.pdf

[学会発表] (計 3件)

①K. Kushiro, A. Ryo and M. Takai, Effects of Hydrogel Microgroove Microtopography on Cell Motility Behaviors. EMN Meeting on Hydrogel Materials, Singapore, Singapore. [2016年5月9日~13日]

②久代京一郎、梁明秀、高井まどか、「癌細胞の悪性化によるマイクロ溝構造における移動性の変化」化学とマイクロ・ナノシステム学会 (CHEMINAS 33)、東京大学生産技術研究所 (東京都目黒区) [2016年4月25日~26日]

③K. Kushiro, A. Ryo and M. Takai, Using Microgroove Topography to Distinguish Non-Cancerous and Cancerous Cell Types through Differences in Directional Cell Motility. *MicroTAS 2015*, Gyeongju, Korea. [2015年10月25日~29日]

[その他]

ホームページ等

<http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/takai/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久代 京一郎 (KUSHIRO, Keiichiro)
東京大学・大学院工学系研究科・助教
研究者番号：90632539

(2) 連携研究者

高井 まどか (TAKAI, Madoka)
東京大学・大学院工学系研究科・教授
研究者番号：40287975

梁 明秀 (RYO, Akihide)
横浜市立大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：20363814