

令和元年6月21日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K18408

研究課題名(和文)細胞形態を指標とするがん悪性度の評価

研究課題名(英文)Evaluation of malignancy of cancer cells based on cellular morphology

研究代表者

田村 磨聖(Tamura, Masato)

大阪大学・核物理研究センター・特任講師(常勤)

研究者番号：20747109

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：培養細胞の形態や増殖様態の違いは、複雑な細胞シグナルに基づいた結果であり、がん細胞の機能を反映する指標となり得る。本研究課題では、細胞の形態が、がん検査の指標として有用か検討するため、ゲル包埋培養中のがん細胞の形態と、がん悪性度の関係について検討した。マウス乳がん由来の細胞株を、コロニー様に増殖する細胞と、顆粒状に増殖する細胞とに分けて行った担癌実験により、腫瘍の増大と転移頻度が異なる結果を得た。本研究成果により、ゲル包埋培養中のがん細胞の形態を指標とし、がん細胞の悪性度を推測できる可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

分子生物学を基礎とした検査結果が、治療に結びつかないがん患者が顕在化してきている。その要因として、一つの腫瘍内に異なる性質を有する複数種のがん細胞の存在、がん不均一性が知られている。この問題を解決するには、現状の組織レベルの検査のみでなく、細胞レベルの検査も必要である。

ゲル包埋培養中のがん細胞の形態は、複雑な細胞シグナルに基づいた結果である。がん細胞の悪性度を反映すると考えられ、細胞レベルの検査の指標として成立し得るが、そのエビデンスは不足している。本研究では、細胞形態とがん悪性度の関係について検討し、細胞形態はがん細胞の性質に関する指標となり得ることを示した。

研究成果の概要(英文)：In this study, I evaluated whether the morphology of cancer cells in gel-embedded culture is related to malignancy of cancer cells. The difference in morphology and growth behavior of cultured cells is a result based on complex cell signals, and is thought to indicate the malignancy of cancer cells. Following an establishment of the cell lines derived from mouse breast cancer into colony-like proliferating cells and granular-like proliferating cells, conducting an animal experiment, the colony-like cells were less frequent of metastasis than the granular-like cells. Although the frequency of metastasis was low, the size of the tumor increased more. The results of this study indicated that the morphology of cancer cells in gel-embedded culture could be useful to distinguish the malignancy of cancer cells.

研究分野：がん

キーワード：がん 細胞形態 がん悪性度

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

がんのテーラーメイド治療は、がん細胞の表面抗原の有無や特定の遺伝子発現・変異を検査して治療方針を決める。しかし、分子生物学を基礎とした検査では、治療に結びつかない患者が顕在化してきた。この問題を解決するには、現状の組織レベルの検査に加えて、細胞レベルの検査も要する。申請者は、光分解性ゲルに包埋した細胞を、形態ごとに分類・分離する3次元細胞分離システムを開発してきた。細胞の形態は複雑な細胞シグナルに基づいて変化するため、細胞機能を端的に表す指標として成立し得るが、そのエビデンスは不足している。

### 2. 研究の目的

背景に記載したように、細胞レベルの検査を実現するうえで、細胞の形態が検査の指標になり得る。本研究では、細胞の形態を基準として分離・株化したマウス乳がん由来がん細胞を用い、細胞形態とがん悪性度の関係を検証する。本研究をとおして、細胞形態が細胞レベルの検査指標となりうるか検討し、形態による細胞分離の有用性を検証する。

### 3. 研究の方法

細胞形態と、がん細胞の悪性度の関係を検証するために、以下の実験を実施した。

マウス乳がん由来細胞 4T1E を、光分解性ゲル中でコロニー様に増殖する細胞と、顆粒状に増殖する細胞の2タイプに分類し、光照射による細胞分離システムで分取・培養した。これら2タイプの細胞を4T1Eのサブポピュレーション細胞として用い、継代後の細胞の形態維持を確認、スフェロイドアッセイによる腫瘍形成能の確認、マウスへの皮下移植によりがん悪性度の推測を行った。

### 4. 研究成果

本研究成果の概要を下記に記載する。詳細は、論文にまとめて発表した<sup>1</sup>。

#### (1) 形態によるマウス乳がん由来細胞 4T1E の分類、樹立

光分解性ゲルによる包埋培養や細胞分離は、既往研究を参考に行った<sup>2</sup>。光分解性ゲル中で4T1E細胞は、主に、コロニー様に増殖する細胞と顆粒状に増殖する細胞に分かれた(図1)。一部、伸展しているような細胞も見られるが、今回の研究では標的とはしていない。これら2種類の細胞を分取し、サブポピュレーション細胞として樹立した。80%コンフルエント程度に細胞が増殖するまで培養して実験開始まで凍結保存した。凍結細胞を起こしてから、増殖させた母株ならびにサブポピュレーション細胞の形態を示す(図2)。ディッシュ上では、顆粒状に増殖する細胞は弱くディッシュに接着している状態で、基本的には顆粒状の形態を維持していたが、一部伸展している細胞も見られた。一方で、コロニー様に増殖する細胞は、接着細胞としてディッシュに伸展しつつ増殖した。

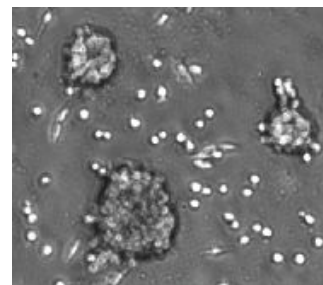


図1 光分解製ゲル中での4T1E細胞の増殖

上記により得た5細胞株(4T1E細胞、4T1E細胞から樹立したサブポピュレーションとして、コロニー様増殖細胞と顆粒状増殖細胞を各2株ずつ)をその後の実験に用いた。

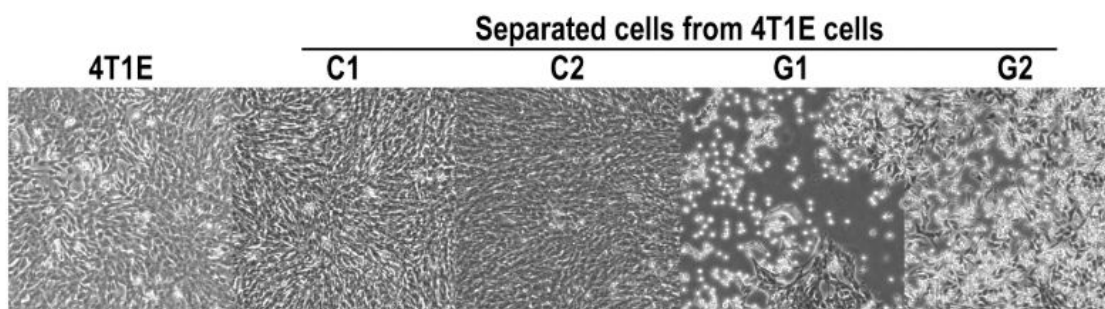


図2 形態別に分取・樹立後の細胞画像<sup>1</sup>。

C1,C2: コロニー様に増殖する細胞, G1,G2:顆粒状に増殖する細胞

#### (2) スフェロイドアッセイによる腫瘍形成能の確認

スフェロイドアッセイには、住友ベークライド株式会社のPrimeSurface96Vを用いた。各細胞は500 cells/wellで播種し、経時的に撮像して、スフェロイドの形成を確認した。培養72時間後の画像を確認すると、4T1E細胞とコロニー様増殖細胞は、いずれもスフェロイドを形成した。一方で、顆粒状に増殖する細胞は、球状のスフェロイドを形成せず、ウェルの底に沈殿した状態で増殖していた。スフェロイドを形成した細胞株は、形成しない細胞株より腫瘍形成能が高いものと推測された。

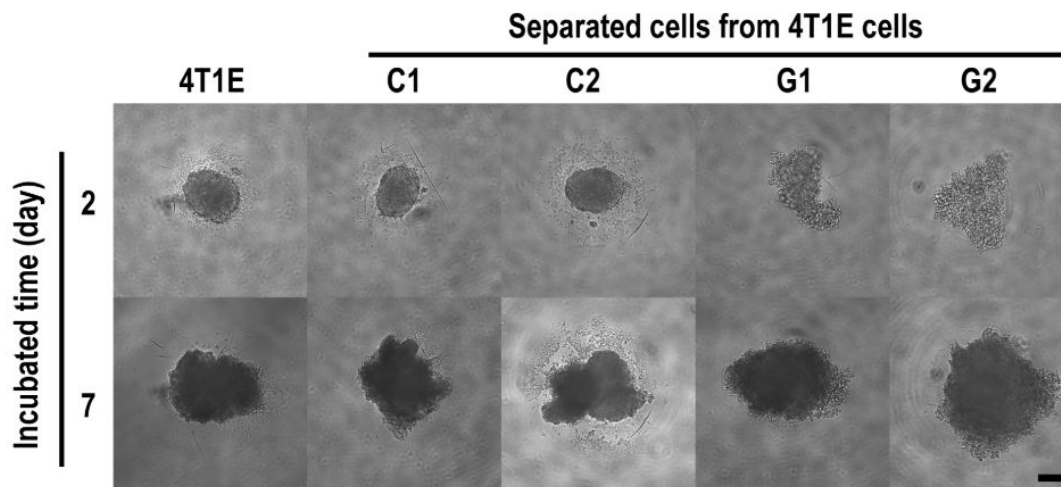


図3 スフェロイドアッセイ<sup>1)</sup>。

C1,C2: コロニー様に増殖する細胞, G1,G2:顆粒状に増殖する細胞。Scale bar: 200  $\mu\text{m}$

### (3) In vivoでのがん悪性度の推測

本実験では、がん悪性度の推測として、腫瘍サイズの増大と転移頻度を評価した。ヌードマウスの皮下に、各細胞株を  $10^6$  cells 移植し、担癌モデルマウスを作製した。約1ヶ月間、体重と腫瘍サイズを経時的に計測すると、4T1E由来の腫瘍に比べ、コロニー様に増殖する細胞由来の腫瘍はサイズが有意に増加した(図4)。顆粒状に増殖する細胞由来の腫瘍は、4T1E由来の腫瘍と同等の腫瘍増大がみられた。このとき、有意ではないが、腫瘍のサイズの増大が少ない傾向があった。これらの腫瘍の増大の結果は、スフェロイドアッセイの結果で推測された通りであった。一方で、観測期間終了後にマウスを安楽死させて解剖すると、肺や肝臓などへの転移は、顆粒状増殖の細胞のほうが高頻度で、コロニー様細胞のほうが低頻度であった。

### (4) 考察

本実験課題では、細胞の形態とがん細胞の悪性度の関連について示した。

本研究結果の汎用性の有無の判断には、エビデンスを増やす必要がある。また、20回までの継代では細胞の形態が維持される結果となったが、継代後の細胞が同様の傾向を示すかは、まだ確認できていない。これらは、今後の研究により解決すべき課題として残った。

得られた研究データは、細胞レベルでの検査の指標として細胞形態を採用する確固たるデータとは言えないが、その可能性を示している。また、形態を指標とする細胞分離が、細胞の性質を大別して行うアッセイに有用であると示唆された。

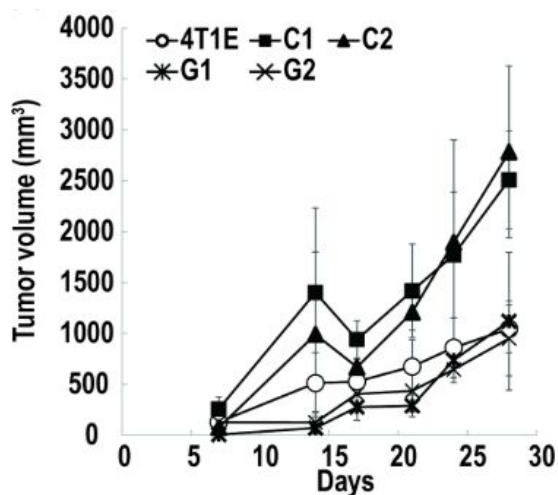


図4 移植後の腫瘍サイズ<sup>1)</sup>。

C1,C2: コロニー様に増殖する細胞由来の腫瘍,  
G1,G2:顆粒状に増殖する細胞由来の腫瘍

### <引用文献>

- Tamura, M. et al. Morphology-based optical separation of subpopulations from a heterogeneous murine breast cancer cell line. *PLoS One* 12, e0179372 (2017).  
 Tamura, M. et al. Click-crosslinkable and photodegradable gelatin hydrogels for cytocompatible optical cell manipulation in natural environment. *Sci. Rep.* 5, 15060 (2015).

### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 1 件)

- Masato Tamura *et al.* Morphology-based optical separation of subpopulations from a heterogeneous murine breast cancer cell line. *PLoS One* 12, e0179372 (2017).DOI:

〔学会発表〕(計 4 件)

日下部涼子,田村磨聖,黒川宏美,杉浦慎治,松井裕史, 細胞形態に基づく腫瘍内不均一性の解析, つくば医工連携フォーラム, 2018

田村磨聖,杉浦慎治,高木俊之,佐藤琢,須丸公雄,金森敏幸,岡田知子,松井裕史, 細胞形態で分別したマウス乳がんサブpopulation細胞の評価, Cheminas37, 2018

Masato Tamura, Shinji Sugiura, Mayu Shibuta, Taku Sato, Toshiyuki Takagi, Kei Kanie, Ryuji Kato, Hirofumi Matsui, Masumi Yanagisawa, Toshiyuki Kanamori, Development of cellular morphology-based separation system for three-dimensional culture, AACR Annual meeting, 2017

田村磨聖,杉浦慎治,渋谷真結,加藤竜司,柳沢真澄,松井裕史,蟹江慧,佐藤琢,高木俊之,須丸公雄,金森敏幸, 腫瘍内細胞の種別解析にむけた自動細胞分離システムの開発, 化学とマイクロ・ナノシステム学会, 第35回研究会(35<sup>th</sup> CHEMINAS), 2017

〔図書〕(計 2 件)

杉浦慎治,田村磨聖 他, 羊土社, 三次元培養細胞分離装置によるがん不均一性の解析, 2018, vol.36(No.2) pp. 65-70

田村磨聖 他, 技術情報協会株式会社, 三次元ゲル培養からの形態情報を用いた細胞塊自動選別装置の開発, 2017, 7章4節 pp.292-301

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

該当なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名: 杉浦 慎治

ローマ字氏名: Shinji Sugiura

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。