

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：13401  
 研究種目：基盤研究(C) (一般)  
 研究期間：2019～2022  
 課題番号：19K09502  
 研究課題名(和文) 膠芽腫の神経好性浸潤機構を高分子ナノファイバーを用い解明し制御する医工学的研究  
  
 研究課題名(英文) Medical engineering research to elucidate and control the neurophilic invasion mechanism of glioblastoma using polymer nanofibers  
  
 研究代表者  
 北井 隆平 (KITAI, RYUHEI)  
  
 福井大学・学術研究院医学系部門・客員教授  
  
 研究者番号：80251990  
 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：膠芽腫は浸潤が高度で予後不良である。膠芽腫細胞の遊走は神経線維に沿うため、それを模したナノファイバーにて細胞の足場を作製した。1. 本実験系が有効であることを示し、膠芽腫が、他ガン細胞株よりも高い遊走性を示すことができた。2. 任意の3D構造を作製でき袋状の足場で3次元の細胞遊走を観察可能とした。3. 細胞の移動方向、距離を定量化し、膠芽腫細胞の一方向性の浸潤を示すことができた。新発見となった。細胞移動に関する細胞内タンパクを生細胞の状態で見ることができた。足場依存性のある細胞遊走、浸潤に対し新規実験系が完成し、今後の薬剤開発にも応用可能な新技術を確立した。

## 研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では新規の細胞浸潤モデルを開発した。特に足場依存性の浸潤を定量化できることが最大の利点である。従前の浸潤モデルでは差がつきにくかった膠芽腫の細胞浸潤に関し、他ガン細胞に比較して早い移動を示すことができた。定量化されているので、絶対値で測定できる。ビデオ撮影も可能であり、一方向性について示すことができ、これは新発見となった。ナノファイバーを用いているので自由な形状で足場を作成することができ、より生体に近い状態での培養系が完成した。浸潤抑制薬は抗ガン剤のターゲットとなるが、それに対するより生体に近いハイスループットな結果を得られる実験モデルが完成した。

研究成果の概要(英文)：Glioblastoma is highly invasive and has a poor prognosis. Since glioblastoma cells migrate along nerve fibers, we created a cell scaffold with nanofibers that imitate them. 1. This experimental system was shown to be effective, and glioblastoma was able to exhibit higher migration ability than other cancer cell lines. 2. Arbitrary 3D structures can be fabricated, and three-dimensional cell migration can be observed using a cystic scaffold. 3. By quantifying the direction and distance of cell migration, we were able to show the unidirectional invasion of glioblastoma cells, which was a new finding. We were able to visualize intracellular proteins related to cell migration in living cells. We have completed a new experimental system for anchorage-dependent cell migration and invasion, and established a new technology that can be applied to future drug development.

研究分野：脳神経外科

キーワード：膠芽腫 細胞浸潤 ナノファイバー 培養モデル

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

膠芽腫は手術等の集学的治療を行っても、浸潤が高度で予後不良である。膠芽腫の外科摘出は他の癌腫と異なり、広範囲切除や治癒切除の概念がない。どれだけ多くの腫瘍細胞を摘出して、残存腫瘍が存在することが前提となっている。術後療法としての放射線療法、化学療法は殺細胞効果を期待する治療である。しかしながら再発は免れず生命予後は初診より 2 年以内がコンセンサスとなっている。革新的な腫瘍抑制を目指す治療法が喫緊の課題である。脳組織に浸潤を抑制する組織は存在せず、自由に浸潤できる環境である。剖検所見で膠芽腫細胞の浸潤、遊走は神経線維束や血管構築に沿うことが知られている。そもそも細胞の特性としてグリア細胞は突起を多く有し、その突起でシナプス保護や血液脳関門の形成など常に細胞形態を変えながら活動する細胞である。細胞突起を伸長することが膠芽腫細胞の特徴とも言える。浸潤阻害による腫瘍制御も注目されつつあるが遊走浸潤機構を明確に評価するモデルが乏しく、生体を模したハイスループットの解析モデルが待たれていた。

### 2. 研究の目的

脳内浸潤が神経線維に沿った遊走であるので、それを模した培養モデル、すなわちファイバーにて細胞の足場をつくり、単一の細胞の状態で遊走実験を行い、動的観察を可能にすることである。本アッセイを用い、膠芽腫細胞遊走の質的、定量的検討を行う。本ファイバーのモデルは自由に成型が可能で、二次元の遊走方向を見るばかりでなく、嚢状の遊走モデルなど 3D での解析が可能であるかも検討する。膠芽腫細胞の浸潤について、既存のモデルと今回のファイバーモデルを比較検討する。膠芽腫に適した浸潤モデルになりうるか検討する。さらにその特徴、遊走メカニズム機序を明らかにする。遊走阻害剤の開発に資することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### 3-1 ファイバー遊走アッセイの作製

polystyrene の細径ファイバーをエレクトロンスピニング法により射出、径 35 $\mu$ m の培養皿上に設置する。単細胞として付着するか検討する。生細胞のまま 24 時間程度の観察が可能かビデオを撮影する。

#### 3-2 既存のアッセイとの比較

細胞：ヒト神経膠腫細胞 U87-MG、ヒト乳癌細胞 MDA-MB-231、ヒト結腸癌細胞 HCT116 及びヒト胃癌細胞 MKN45 を使用する。

創傷治癒アッセイ：細胞を培養皿上で飽和させ 800 マイクロメートル幅の無細胞野を作成し、4 時間ごとに無細胞野の面積を測定する。

トランスウェル遊走アッセイ：上下のチャンバーを 8  $\mu$ m の小孔の膜で挟んだ Migration Assay を使用する。細胞を上部チャンバーに播種、24 時間後に膜を通過した細胞を染色し、吸光度を測定する。

ファイバー遊走アッセイ：polystyrene の細径ファイバーをエレクトロンスピニング法により射出、径 35 $\mu$ m の培養皿上に設置する。ファイバーに細胞を付着させ、タイムラプス顕微鏡で 10 分ごとに 3 時間追跡し、移動距離、運動の方向を計測する。

3-3 細胞骨格タンパクの定量 培養皿上とファイバー上の付着細胞でのアクチンとチューブリンタンパクをウェスタンブロットング法で評価する。

3-4 生細胞骨格タンパクのタイムラプス観察：生細胞のアクチンとチューブリンを蛍光染色し、タイムラプス顕微鏡で撮影、その局在の動的変化を観察する。

3-5 上記のファイバーモデルを嚢状に成型し細胞を付着させ、遊走をビデオ観察できるか検討する。

### 4. 研究成果

4-1 ファイバー上に細胞は付着し、数分のタイムラグのあとファイバー上を移動しはじめた。細胞突起はファイバーに絡めるように伸長し、ファイバーから落下することなく移動を観察できた。

4-2 既存アッセイとの比較 1. ヒト神経膠腫細胞 U87-MG とヒト乳癌細胞 MDA-MB-231 は、創傷治癒アッセイで高い遊走を示した。(図 1)

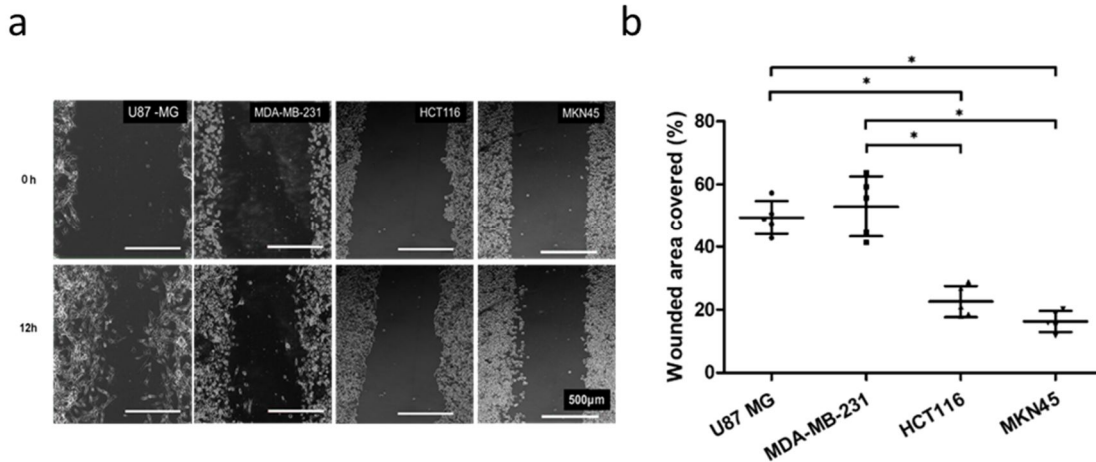


図 1 a:実際の画像 b: 定量値

4-3. ヒト神経膠腫細胞 U87-MG とヒト乳癌細胞 MDA-MB-231 は、トランスウェル遊走アッセイでも高い浸潤活性を示した。(図 2)

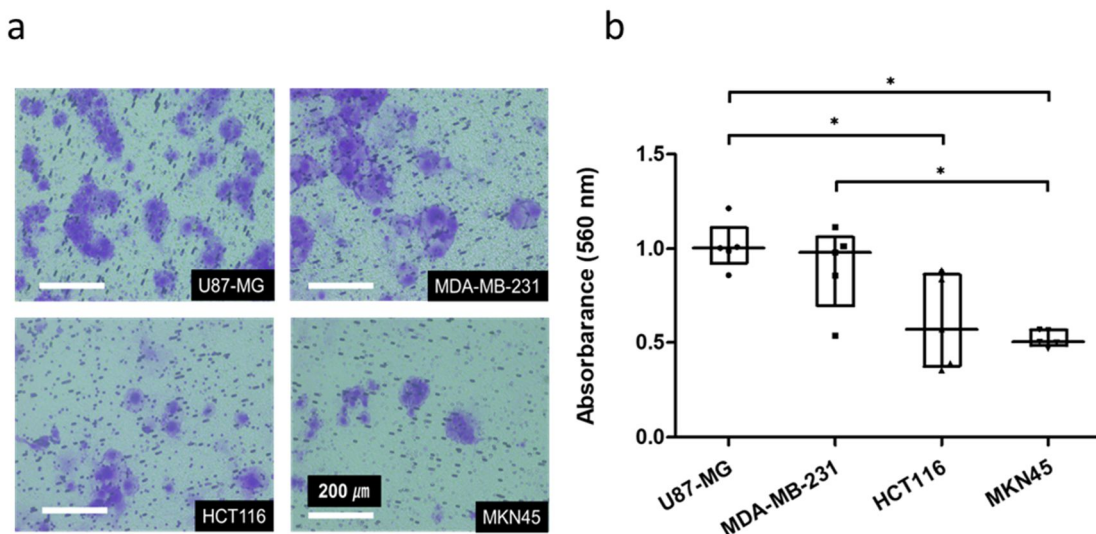
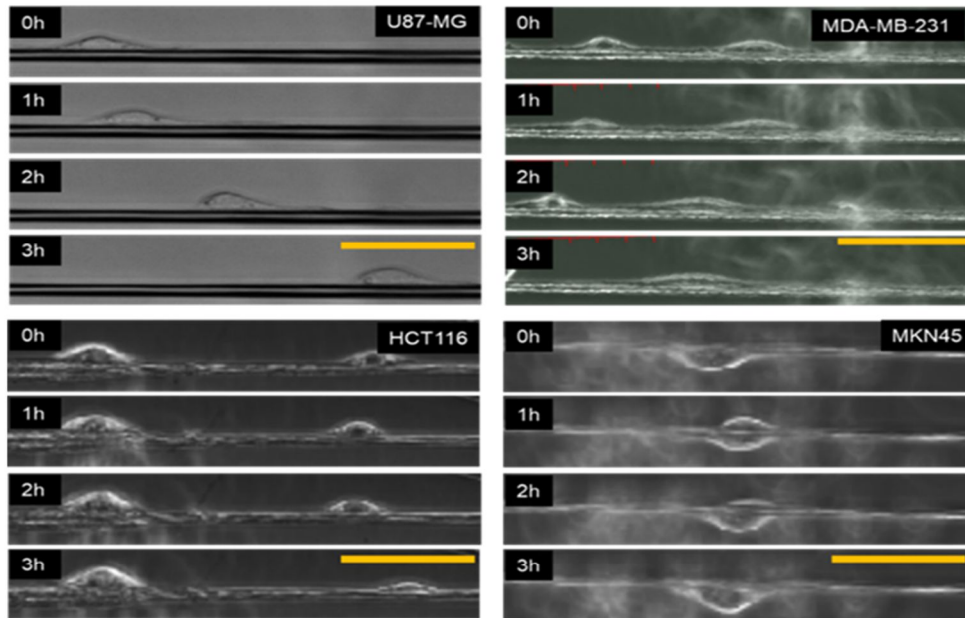


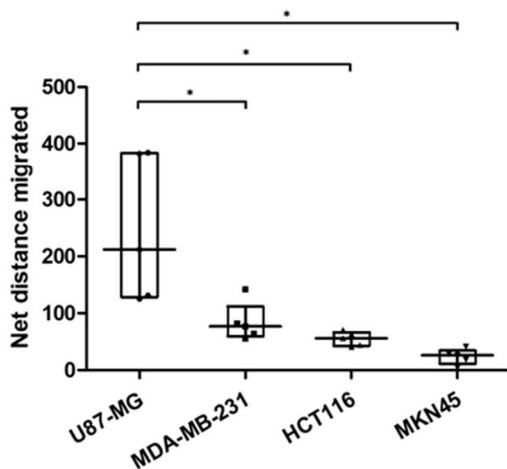
図 2 a:実際の画像 b: 定量値

4-4 ヒト神経膠腫細胞 U87-MG は、ファイバー上の単一細胞遊走アッセイで最速の遊走能を示した。単一細胞での細胞遊走能を、新規開発ファイバー遊走アッセイで評価した。ヒト神経膠腫細胞 U87-MG は、他の細胞株よりもファイバー上で最も速い遊走を示した。移動方向を定量化するために、初期値の座標を 0 とし、一方向の移動を定量化すると、ヒト神経膠腫細胞 U87-MG の方向性は 1 (一方向性) に近く、方向性を有することが明らかであった。一方で他細胞株は左右ランダムな移動を示した。(図 3)

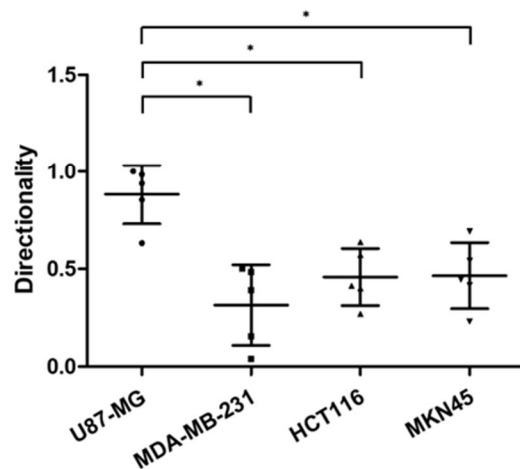
a



b



c



(図3) a:実際の画像 b: 定量値 c:一方向性の証明

4-5 培養足場によるチューブリンまたはアクチンの発現：チューブリンの発現は U87-MG 細胞で高いが、培養の足場による影響はなかった。

4-6 チューブリンとアクチンの発現レベルが細胞株や培養足場によって違いがあるか検討した。細胞を培養皿またはファイバー上に播種し比較した。Western Blotting 法で定量するとチューブリンの発現は他の細胞株に比べ U87-MG 細胞で高い発現を示した。培養皿を足場とした場合とファイバー上で培養した細胞間では、それらの発現量に有意な差は認めなかった。(図4)

4-7. ファイバー上遊走アッセイ上での細胞内チューブリンの局在：ファイバー上で培養したヒト神経膠腫細胞 U87-MG の細胞骨格タンパク質を染色し、中心体からの微小管の伸長方向と細胞運動の方向を生細胞において視覚化した。チューブリンは、細胞が伸長するのと同方向に伸長することが観察された。アクチン染色は、ファイバーと絡み合った両端で動的な凝集を示した。

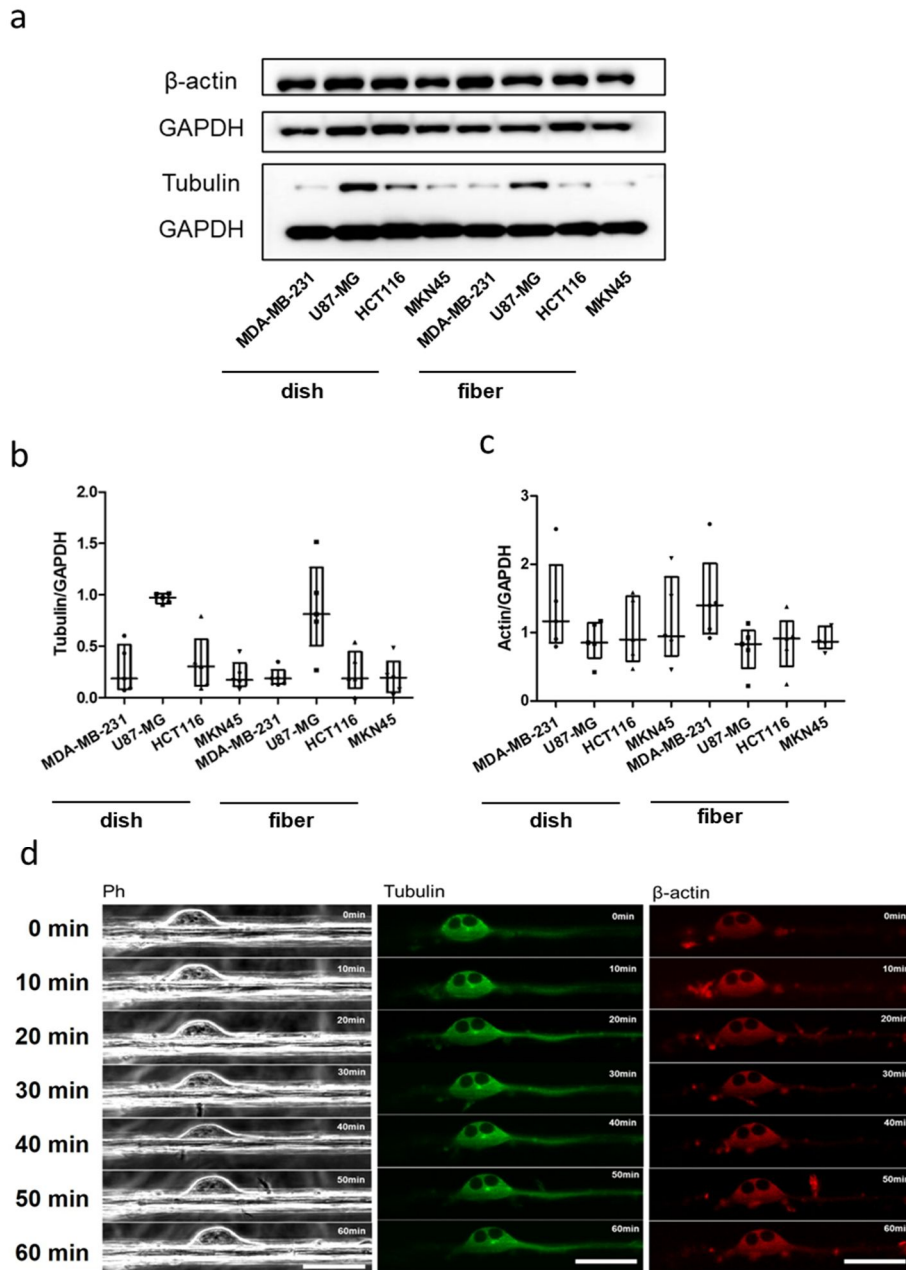


図4 足場の違いによる発現 a:ウエスタブロットティング b,c: 定量値 d 局在

4-8 囊状のモデルも作製でき、腫瘍細胞が壁面を覆うことが示された。論文として発表した。

#### 【まとめ】

神経膠腫は高い浸潤性により治療が困難である。浸潤遊走能に注目した研究は多いが、他臓器の癌で用いられる実験系を使用しているため、神経膠腫特有の浸潤について明確化することが出来なかった。創傷治療およびトランスウェルモデルではヒト神経膠腫細胞 U87-MG 及び ヒト乳癌細胞 MDA-MB-231 が他の癌腫に比べ、高い遊走を示した。しかしながら、ファイバーを用いた今回の新規開発の遊走アッセイでは、ヒト神経膠腫細胞 U87-MG の遊走能が ヒト乳癌細胞 MDA-MB-231 の遊走能よりも高いことを明らかにできた。特に本アッセイは移動方向、速度、及び細胞の形状をタイムラプスで生細胞を経時的に観察することで定量化できる。他の固形癌の細胞株と比較して、ヒト神経膠腫細胞 U87-MG は一方向移動の傾向を示したことは、新しい知見である。蛍光色素を使用し、遊走中の細胞の細胞骨格ダイナミクスを観察可能とし間葉系遊走を明らかにした。開発したファイバーモデルでは、ファイバー表面に各種タンパクをコーティングすることが出来、新たな浸潤モデルとして極めて有用である。工業的に安定した培養システムを構築できたため、多数の遊走制御候補タンパクをスクリーニングできることも利点である。遊走制御候補薬剤開発の重要なツールとなりうる。独創的な医学工学の融合した研究となった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Wan-Ying Huang, Norichika Hashimoto, Ryuhei Kitai, Shin-Ichiro Suye, Satoshi Fujita	4. 巻 13
2. 論文標題 Nanofiber-Mache Hollow Ball Mimicking the Three-Dimensional Structure of a Cyst	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Polymers (Basel)	6. 最初と最後の頁 2273
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/polym13142273	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ryuhei Kitai, Toshiaki Kodera, Hiroshi Arai et al	4. 巻 25
2. 論文標題 Successful treatment of fibrosarcoma in the occipital bone. A case report	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Interdisciplinary Neurosurgery	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.inat.2021.101218	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	藤田 聡  (SATOSHI FUJITA)  (60504652)	福井大学・学術研究院工学系部門・教授    (13401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------