

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：35302

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500523

研究課題名(和文)ハイパーサーミアが癌細胞の力学的特性におよぼす影響

研究課題名(英文)Effect of hyperthermia on mechanical property of cancer cell

研究代表者

内貴 猛 (NAIKI, Takeru)

岡山理科大学・工学部・教授

研究者番号：40241385

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：ハイパーサーミア(温熱治療)はがんを含む組織に熱刺激をあたえて正常細胞は温存したままがん細胞のみを死滅させる方法であり、本研究では熱刺激ががん細胞の細胞骨格の構造と細胞のステイフネス(硬さ)におよぼす影響を調べた。その結果、熱刺激により細胞内のアクチン線維と微小管、接着斑の構造が変化し、刺激後40分位で生き残る細胞と死ぬ細胞との間に違いが見られることがわかった。また、原子間力顕微鏡を使用して細胞のステイフネスを測定できる方法を確立した。さらにがん組織をマウス体内に作製する手技を確立した。

研究成果の概要(英文)：Hyperthermia is the technique that induces cell death only in cancer cells by heat stimulation. In the present study, the effects of heat stimulation on the structure of cytoskeletons and cell stiffness were analyzed. As the results of the study, the structures of actin fibers, microtubules, and desmosomes changed by heat stimulation, and the differences between living cells and dying cells were observed at about 40 minutes after stimulation. The techniques to measure cell stiffness by atomic force microscope and make the cancer models in mice were developed. Hyperthermia is the technique

研究分野：バイオメカニクス

キーワード：ハイパーサーミア 細胞骨格 細胞生存率 細胞ステイフネス 原子間力顕微鏡 がん治療

1. 研究開始当初の背景

死亡原因となる疾患の中で死亡者数が多く最も重要なのががん(癌、肉腫)である。そのため、がんを治療する方法の開発が急がれ、多くの治療方法が開発されてきた。その一つがハイパーサーミア(温熱治療)であり、化学療法や放射線療法のような強い副作用がなく、患部を暖めることは古来よりおこなわれており、患者への心理的負担が少なく、装置が簡単に作製できるという利点がある。しかし、その効果は少なく、現在は化学療法や放射線療法と併用してがん治療に使用されている。

ハイパーサーミアはがんを含む組織を43位に暖めて正常細胞は温存したままがん細胞のみを選択的に死滅させる方法である。ハイパーサーミアによりがん細胞を選択的に死滅させることができるのは、がん組織内の血液流量が加温により正常組織よりも増えないことが原因であることがわかっている。すなわち、正常組織では熱刺激をあたえると組織中の灌流流量が増加して組織の温度上昇を抑えるのに対し、がん組織中の血管は拡張能に乏しく熱刺激をあたえても灌流流量が増加せず組織の温度が上昇する。そのため、正常組織の温度が細胞の致死レベル以下に、がん組織の温度が致死レベル以上になるような熱刺激をあたえることにより、がん細胞を選択的に死滅させることができる。しかし、組織や部位により血管の本数や太さ、周辺組織の熱伝導性が異なり、がん細胞を選択的に死滅させるための最適な熱刺激条件が異なることがハイパーサーミアの効果を下げる原因になっている。そこで、ハイパーサーミア治療中にがん組織内の温度や周辺組織内の温度を常に監視することが必要とされている。現在はまだ非侵襲的に組織内の温度を測定する技術は実用化されておらず、熱電対やサーミスタ等のセンサを組織に刺して温度を計測している。そのため、測定点数が限られることやセンサの刺入によるがん細胞の転移、細菌感染の誘発の危険性を伴うことが問題になっている。

一方で、細胞が置かれている環境(組織内のpH、栄養状態、酸素状態など)により熱耐性が異なり、同じ温度に加温してもがん細胞が死滅する場合と死滅しない場合があることがわかってきた。このような問題を解決するために、培養細胞を使用して温熱の作用機構を解明する研究がなされている。最近では細胞周期によって細胞の熱刺激に対する感受性が異なることがわかってきた。また、熱刺激を与えると細胞骨格が変化する可能性があることが示唆された。

細胞骨格(アクチンファイバ、微小管、中間径フィラメント)は細胞内の輸送機能に重要な役割を果たしているばかりではなく、細胞の形を保ち、細胞の硬さを決定している。がん細胞の硬さについては幾つかの研究結果が報告されており、例えば、がん患者の血

中に流れているがん細胞は正常細胞より軟らかいという研究結果¹⁾が報告されている。がん細胞は原発巣で増殖し、組織がある程度の大きさになったところで、リンパ管や血管に侵入してリンパ液や血液の流れによって他の場所に転移する。血液中を流れているがん細胞が正常細胞より軟らかいことから、がん細胞は細胞骨格の構造を変化させてリンパ管や血管へ侵入しやすくしていると考えられる。もし熱刺激によりがん細胞の細胞骨格構造が変化して、軟らかくなるのであれば、ハイパーサーミアの本来の目的とは逆に、がん細胞が転移することを促進してしまう危険性がある。しかし、熱刺激ががん細胞のスティフネス(硬さ)におよぼす影響については全くわかっていない。

2. 研究の目的

ハイパーサーミア(温熱治療)はがんを含む組織に熱刺激をあたえて正常細胞は温存したままがん細胞のみを死滅させる方法である。しかし、熱刺激により細胞のスティフネスが変化するのかどうかについてはほとんどわかっていない。本研究では、熱刺激ががん細胞の細胞骨格の構造と細胞のスティフネス(硬さ)におよぼす影響を調べ、細胞を軟らかくすることなく細胞死を誘引できる刺激条件、すなわち効率的にがん細胞を死滅させる方法を開発することをめざす。

3. 研究の方法

HeLa細胞(ヒト子宮頸部癌細胞)とEnd1/E6E7細胞(正常ヒト子宮頸部扁平上皮細胞)を実験対象として使用した。これらの細胞には予めGFPアクチンの遺伝子(CellLight Actin-GFP BacMam 2.0, Invitrogen社)とRFPチューブリン(CellLight Tubulin-RFP BacMam 1.0)あるいはRFPタリンの遺伝子(CellLight Talin-RFP BacMam 2.0)を導入した。これらの遺伝子を導入することにより、それぞれアクチン線維と微小管、接着斑(タリンは接着斑を構成する要素)を、細胞が生きたまま蛍光顕微鏡で観察できるようになる。2つの遺伝子を同時に導入して、アクチン線維とインテグリン、あるいはアクチン線維と微小管を同時に観察できるようにした。それらの細胞を播種した培養ディッシュをホットプレートに乗せて細胞を43にして5分間熱刺激を与えた。その後、現有の蛍光顕微鏡に設置する培養装置(購入装置)に入れて、37に戻した。細胞骨格(アクチン線維、微小管)あるいは接着斑が観察しやすい1つの細胞に着目し、10分毎の蛍光画像を撮影し、細胞骨格(アクチン線維、微小管)と接着斑の変化を観察した。アクチン線維と微小管については平均蛍光強度を画像から計測し、接着斑については数を計測して観察結果を定量的に検討した。これらの観察を24時間まで適度に撮影間隔を調整して行った。

細胞のスティフネス（硬さ）の計測には現在の原子間力顕微鏡（AFM）を使用した。カバーガラスに播種した HeLa 細胞を AFM に設置して細胞の中心部と周辺部のフォースカーブを測定した。フォースカーブはプローブ先端の圧子を細胞に押しつけたときの力と押し込み量の関係を表すカーブであり、それから細胞のスティフネスおよび弾性係数を求めることができる。スティフネスは弾性係数と同様に硬さを表す指標であるが、我々が提案しているスティフネスはフォースカーブが指数関数で近似できることを利用しているため、弾性係数よりも適応範囲が広く、細胞全体の力学的特性に近い指標であると考えている。

癌細胞と正常細胞の差異に着目し、温度を 42、43、44、45、刺激時間を 7、12、17 分に設定して、どのような条件で癌細胞と正常細胞の間に違いが見られるのかを、細胞生存率を測定して検討した。熱刺激を与えてから時間後の全細胞数とトリパンブルーで染色された死細胞の数を測定し、細胞生存率を求めた。

がん組織におよぼす熱刺激の影響を検討するために、ヌードマウス（免疫系阻害マウス）の背中皮下に HeLa 細胞を注入し、がん組織を作製する方法を検討した。

4. 研究成果

HeLa 細胞と End1/E6E7 細胞にアクチン線維と微小管、接着斑を観察するための遺伝子を導入した結果、End1/E6E7 細胞については明確なアクチン線維が観察されなかった。そこで、HeLa 細胞のみで熱刺激が細胞骨格におよぼす影響を検討した。熱刺激を細胞に与えた結果、アクチン線維と微小管、接着斑は熱刺激開始直後から分解されていくことがわかった。そして 40 分位で生き残る細胞と死ぬ細胞に違いが見られるようになり、生き残る細胞はアクチン線維と微小管、接着斑の再構築が始まったのに対し、死んでいく細胞は熱刺激開始から 60 分位で完全にアクチン線維と微小管、接着斑が観察されなくなった。これらの結果から熱刺激による細胞の死に、細胞骨格の変化が何らかの形で関係していることがわかった。

原子間力顕微鏡（AFM）を用いて細胞のスティフネスにおよぼす熱刺激の影響を検討するため、熱刺激を与えない HeLa 細胞のスティフネスを測定し、細胞のスティフネスを検討する方法を確立した。AFM は一般的に物体表面をスキャンして物体表面の凹凸形状を画像化するために使用されているが、AFM のカンチレバーを物体に押し込むことにより、物体表面近傍の力学的特性を測定することができる。カンチレバーを押し込んだ際の押込量と荷重との関係（フォースカーブ）からその部位のスティフネス（硬さ）がわかる。フォースカーブをヘルツモデル（荷重が押込量の二乗に比例）に近似し、弾性係数を求め

て、スティフネスを評価することが一般に行われている。しかし、荷重が押込量を底とする指数関数に比例する新たなモデルを使用することにより、ヘルツモデルよりも深い位置のスティフネスをも評価することができることを明らかにした。このように力学的特性を表す関係曲線を指数関数で近似することは、生体軟組織ではよく行われているが、細胞においても指数関数モデルが力学的特性をよく表すことを初めて実証した。そして、熱刺激に先立ち繰り返し伸展刺激が細胞のスティフネスにおよぼす影響を検討した結果、伸展刺激を与えると一時的に癌細胞の表面のスティフネスは高くなり、軟らかくなってから 6 時間程度の後には元に戻るということがわかった。これらの変化はおそらく伸展刺激にもなって細胞骨格の再構築が起こっているためだと考えられる。もしそうであれば、熱刺激を与えた際の細胞骨格の変化を細胞のスティフネスを測定することにより検討することができるが、今回の研究では細胞に熱刺激を与えたときのスティフネスの変化を測定するまでには至らなかった。

熱刺激が細胞骨格におよぼす影響を幾つかの熱刺激条件において検討したが、死滅する細胞が想定よりも少なく、死滅する細胞を探すのに苦労した。そのため、研究の原点に戻り、HeLa 細胞に与える熱刺激条件（温度と時間）が細胞死におよぼす影響を検討した。その結果、一般的に教科書に記載されている 42.5 よりも高い 45 以上の熱刺激を与えなければがん細胞の生存率が低下しないことがわかった。研究開始前に想定していた熱刺激条件が本研究で使用した細胞には適切ではないことが判明した。今後は 45 程度の高い温度の熱刺激を与えてその影響を検討しなければならないことがわかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

保崎尚哉, 内貴 猛, がん細胞のスティフネスにおよぼす繰り返し引張りひずみの影響, 第 25 回バイオフィロンティア講演会講演論文集, 査読無, 14-51, 2014, 33-34

〔学会発表〕(計 1 件)

保崎尚哉, 内貴 猛, がん細胞のスティフネスにおよぼす繰り返し引張りひずみの影響, 第 25 回バイオフィロンティア講演会, 2014 年 10 月 3~4 日, 鳥取市

〔図書〕(計 1 件)

佐藤岳彦他著, 社団法人日本機械学会, 「高度物理刺激と生体応答に関する研究分科会 (P-SCC12)」成果報告書, 2015, 総ページ数 209

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内貴 猛 (NAIKI, Takeru)

岡山理科大学・工学部・教授
研究者番号：40241385

(2)研究分担者

林 紘三郎 (HAYASHI, Kozaburo)
岡山理科大学・工学部・教授
研究者番号：90026196

松木 範明 (MATSUKI, Noriaki)
岡山理科大学・工学部・教授
研究者番号：90284520

原 啓文 (HARA, Hirofumi)
岡山理科大学・工学部・准教授
研究者番号：80511071